



Arnaldo Fim Neto

**“Estudo da atividade contrátil do coração do inseto *T.molitor*:
instrumentação e experimentação”**

Campinas

2012



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Autor: Arnaldo Fim Neto

**“Estudo da atividade contrátil do coração do inseto *T.molitor*:
instrumentação e experimentação”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica. Área de concentração: **Engenharia Biomédica**

Orientador: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Arnaldo Fim Neto, e orientada pelo Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani.

Assinatura do orientador

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

F489e Fim Neto, Arnaldo
Estudo da atividade contrátil do coração do inseto
T.molitor: instrumentação e experimentação / Arnaldo
Fim Neto. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Pedro
Xavier de Oliveira.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Tenebrio. 2. Coração. 3. Instrumentação. 4.
Atividade inotrópica. I. Bassani, José Wilson
Magalhães, 1953-. II. Oliveira, Pedro Xavier de. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Study of contractile activity of the insect heart *T.molitor*:
instrumentation and experimentation

Palavras-chave em Inglês: Tenebrio , Heart, Instrumentation, Inotropic activity

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: José Wilson Magalhães Bassani, Arício Xavier Linhares, Sérgio
Santos Muhlen

Data da defesa: 13-12-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidato: Arnaldo Fim Neto

Data da Defesa: 13 de dezembro de 2012

Título da Tese: "Estudo da Atividade Contrátil do Coração do Inseto T.molitor: Instrumentação e Experimentação "

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente): _____

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares: _____

Prof. Dr. Sérgio Santos Muhlen: _____

“Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, Rita de Cássia Silva e Ademir de
Albuquerque Fim, e à minha querida avó
Diva de Albuquerque Fim”

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rita de Cássia Silva e Ademir de Albuquerque Fim, e à minha avó Diva de Albuquerque Fim pelo amor incondicional e por terem sempre me incentivado a estudar.

Ao meu orientador José Wilson Magalhães Bassani pela oportunidade, orientação, aprendizado, confiança e paciência.

Ao meu co-orientador Pedro Xavier de Oliveira pela orientação e pelo constante apoio ao desenvolvimento da instrumentação neste trabalho.

Aos professores, funcionários e estagiários do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, especialmente pelo apoio técnico do engenheiro Sérgio Paulo Moura, dos técnicos Carlos Alberto Lourenço da Silva, Mauro Sérgio Martinazzo e Renato da Silva Moura, à secretária Larissa Rossi Karschel e à bióloga Elizângela S. de Oliveira.

Aos alunos e ex-alunos do Departamento de Engenharia Biomédica e aos colegas de laboratório pelas sugestões e aprendizado: Danielle F. Feliciano, Hélcio F. Sarabando, Jair Trapé Goulart, Marcelo de A. Viana, Marcelo S. da Rocha, Marina C. Monteiro e Natália F. Oshiyama.

Aos meus amigos pela torcida pela realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas da 'República' Pólvora pelos bons momentos.

Aos meus familiares, em especial às minhas irmãs Camila Silva Fim e Fabíola Silva Fim Molinari.

Aos meus sobrinhos Gabriel Fim, Maria Vitória e Samuel Fim que sempre me recebiam com carinhoso abraço quando estava de volta em casa.

APOIO

Este trabalho teve o apoio financeiro do CNPq (302996/2011-7).

RESUMO

O vaso dorsal de insetos tem sido proposto como um modelo mais simples para estudar o desempenho do coração em diferentes condições. O vaso dorsal apresenta características semelhantes às encontradas no coração de vertebrados (e.g. atividades cronotrópica e inotrópica dependentes do ambiente iônico e da ação de neurotransmissores), mas os mecanismos envolvidos na sua atividade inotrópica estão pouco explorados. Neste trabalho, desenvolvemos instrumentação e métodos com o objetivo de estudar aspectos da atividade inotrópica *in situ* do vaso dorsal do coleóptero *T. molitor*. Foram desenvolvidos dois métodos para estimar a redução do diâmetro luminal do vaso dorsal durante as contrações. Um foi baseado na detecção da “quantidade de luz” emitida por um conjunto de *pixels* de uma imagem de vídeo do centro do lúmen do vaso, e o outro, na medição do diâmetro do lúmen, como visto na imagem de vídeo. Os métodos se mostraram aplicáveis, mas o último foi menos sensível a variações das condições experimentais. O diâmetro diastólico luminal foi $148,70 \pm 5,09 \mu\text{m}$, consistente com dados da literatura. Com a instrumentação desenvolvida, e a partir do controle da frequência de contrações por meio de estimulação elétrica, foi possível estudar o efeito de intervenções inotrópicas. A relação entre a redução de diâmetro (amplitude da contração) e frequência foi negativa ($p < 0,05$ na faixa de 1,0-2,5 Hz). A incubação do coração com cafeína, que tipicamente depleta a carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), produziu um efeito inotrópico negativo, diminuindo a redução sistólica do diâmetro luminal de $56,32 \pm 4,85$ para $35,05 \pm 3,86 \%$ ($n = 7$, $p < 0,05$), o que sugere um papel funcional do RS na atividade inotrópica. O aumento da concentração externa de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) na faixa de 0,5 a 8,0 mM, durante estimulação elétrica a 1,5 Hz, aumentou significativamente a amplitude das contrações de $43,23 \pm 2,51$ para $66,60 \pm 3,31\%$ do diâmetro luminal ($n=7$, $p < 0,05$). Os resultados mostram que ambos $[\text{Ca}^{2+}]_o$ e carga de Ca^{2+} do RS são fatores regulatórios importantes da atividade contrátil do vaso dorsal do *T. molitor*, além de afetar a atividade cronotrópica, como demonstrado previamente no nosso laboratório.

Palavras-chave: *Tenebrio molitor*, vaso dorsal, contagem de *pixels*, atividade inotrópica

ABSTRACT

The dorsal vessel of insects has been proposed as a simplified model to study the performance of the heart. The dorsal vessel shares important features with the vertebrate heart (e.g. chronotropic and inotropic activities affected by the ionic environment and neurotransmitters), but the mechanisms involved in its inotropic activity are not clear yet. In this work, we developed instrumentation and methods aiming at studying the contractile activity of the *in situ* dorsal vessel of the coleopteran *T. molitor*. Two methods were developed to estimate the decrease in the dorsal vessel lumen during contractions. One was based on the detection of the "amount of light" emitted by a set of *pixels* at the center of the dorsal vessel video image, and the other, on the measurement of the luminal width in the dorsal vessel image. The methods were shown to be applicable, but the latter was less sensitive to variations in the experimental conditions. The measured diastolic diameter of the dorsal vessel was $148.70 \pm 5.09 \mu\text{m}$, which was consistent with the values in the literature. With the developed instrumentation, and by controlling the beating rate by electrical stimulation, it was possible to study the effect of inotropic interventions. The relationship between contraction amplitude and stimulation rate was negative ($p < 0.05$ in the range of 1.0-2.5 Hz). Incubation of the heart with caffeine, which typically depletes the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} load, produced a negative inotropic effect, decreasing the systolic reduction of luminal diameter from 56.32 ± 4.85 to $35.05 \pm 3.86 \%$ ($n = 7$, $p < 0.05$), which is suggestive of a functional participation of the SR in the inotropic activity. Increasing the extracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) in the range of 0.5 - 8.0 mM during electrical stimulation at 1.5 Hz significantly increased contraction amplitude from 43.23 ± 2.51 to $66.60 \pm 3.31\%$ of the luminal diameter; ($n=7$, $p < 0.05$). The present results show that both $[\text{Ca}^{2+}]_o$ and the SR Ca^{2+} load are important factors in the regulation of the contractile activity of the *T. molitor* dorsal vessel, in addition to their influence on the chronotropic activity, as previously observed in this laboratory.

Keywords: *Tenebrio molitor*, dorsal vessel, *pixel* counting, inotropic activity

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
APOIO	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	9
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1-Animais	10
3.2-Solução Fisiológica	10
3.3-Preparação biológica	10
3.4-Dispositivos e Equipamentos	11
3.4.1-Set-up para medição da atividade contrátil do vaso dorsal	11
3.4.2-Programa de medição do diâmetro luminal do vaso dorsal	12
3.4.3-Simulação de um fotosensor	18
3.5-Procedimentos experimentais	20
3.5.1-Ajuste linear entre os métodos de medição das amplitudes de contração	20
3.5.2-Resposta cronotrópica a distintas concentrações externas de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$)	20
3.5.3-Curva intensidade-duração no coração do inseto	21
3.5.4-Relação entre a atividade inotrópica e cronotrópica	21
3.5.5-Resposta inotrópica a distintas $[\text{Ca}^{2+}]_o$ no líquido de perfusão	21

3.5.6- Resposta inotrópica a Caff-10	22
3.6-Análise estatística	22
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	23
4.1-Instrumentação	23
4.2-Software	24
4.3-Alteração da frequência espontânea para diferentes $[Ca^{2+}]_o$	29
4.4-Curva intensidade-duração	30
4.5-Relação entre a atividade inotrópica e cronotrópica	32
4.6-Atividade inotrópica positiva do aumento de $[Ca^{2+}]_o$	33
4.7- Resposta inotrópica negativa à cafeína	35
CAPÍTULO 5- DISCUSSÃO	37
5.1 – Instrumentação	37
5.2 – Experimentação fisiológica	38
CAPÍTULO 6- CONCLUSÕES	42
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - (A) Coração (heart) e aorta (modificado de Bassani *et al.*, 2010). (B) divisão anatômica do vaso dorsal (coração-Cor e aorta-Ao), lúmen do vaso (L). Na porção mais abdominal, O (seta) ilustra um dos pares de óstios por onde hemolinfa é admitida. Nas regiões adjacentes aos diversos segmentos, os músculos alares oferecem suporte e podem ter papel na abertura do coração. (C) Processo de propulsão da hemolinfa da região mais abdominal para mais cefálica. 2
- Figura 2 - Estágio adulto do coleóptero *Tenebrio molitor*. 3
- Figura 3 - Esquema geral do transporte de Ca^{2+} no miócito cardíaco e principais mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração e relaxamento do músculo cardíaco. 7
- Figura 4 - Esquema da instrumentação desenvolvida para estudo da atividade contrátil do vaso dorsal do inseto (A) seringa com líquido de perfusão; (B) sistema de vácuo; (C) estimulador elétrico; (D) osciloscópio; (E) sistema de movimentação x,y com a câmara de perfusão (ampliação da ilustração da câmara no canto superior esquerdo); (F) iluminação; (G) objetiva; (H) Câmera de vídeo; (I) placa de aquisição de vídeo e (J) computador para exibição e gravação dos vídeos. 12
- Figura 5 - Dois quadros de um vídeo do vaso dorsal relaxado (A e C, diástole) e um contraído (B, sístole). A linha branca nos quadros A, B e C contém uma janela de análise (W-T) para detecção da largura do lúmen. Em D, E e F são apresentadas as intensidades luminosas de cada pixel da linha selecionada (não filtrado: traçado pontilhado e filtrado: traçado contínuo). A região entre os círculos corresponde ao lúmen (painéis A, B, C, D, E e F). A Figura 5 G ilustra as mudanças na contagem de *pixels* durante a contração do vaso dorsal. A Figura 5-H mostra o sinal visto na Figura 5 G, invertido. 14
- Figura 6 - Vaso dorsal durante a diástole (A, um quadro de vídeo). A região entre os círculos em A mostra uma região com intensidade luminosa idêntica ao do lúmen. O segmento W-T em B mostra a janela de detecção que será imune a *pixels* com intensidades luminosas idênticas ao do lúmen. 15
- Figura 7- Vaso dorsal durante a sístole, A, e diástole, B. O círculo em A ilustra *pixels* de intensidade luminosa igual, mas que não pertencem ao lúmen (círculos em B). Em A, B, C e D é ilustrado a janela fixa de análise W-T que se torna móvel (X-Y) nos painéis E, F, G e H. Nestes painéis é ilustrada a situação em que a janela móvel X-Y próxima ao lúmen (círculos em E e F) diminui (G e H) de modo a não computar os *pixels* no círculo em G e H. Caso a janela X-Y em G e H fosse do mesmo tamanho em E e F, estes *pixels* fora da região do lúmen seriam computados, e a largura do lúmen superestimada. 16

Figura 8- Ilustração da janela de detecção. No primeiro quadro a janela de detecção é fixa (W-T) e o vaso dorsal se encontra na diástole. Conforme ocorra contração e relaxamento do vaso dorsal, o número de *pixels* acima do limiar varia de quadro para quadro, e o tamanho da janela de detecção X-Y também varia. 17

Figura 9- Interface gráfica do programa desenvolvido para medição das amplitudes de contração do vaso dorsal do inseto. Deve-se selecionar a linha, coluna1 (W), coluna2 (T), quadro, o intervalo da janela móvel e o limiar. O programa exhibe o quadro com a linha selecionada (canto inferior esquerdo), um vídeo com perfil da intensidade luminosa *pixel a pixel* da linha selecionada (canto superior direito) e a amplitude de contrações (valores invertidos) em μm em função do tempo (canto inferior direito). 18

Figura 10 - Em A e B são apresentados quadros com a região que simula o fotosensor e seus histogramas na diástole e sístole, respectivamente. A seta nos histogramas indica o número de *pixels* que compõe a região mais iluminada do sinal de vídeo. Em C é ilustrada a curva média das intensidades luminosas dos *pixels* da região simulada em função do tempo..... 20

Figura 11 – Montagem da instrumentação para estudo da atividade contrátil do vaso dorsal. O painel (A) mostra a seringa com líquido de perfusão (1), sistema de vácuo (2) e o microscópio com a fonte de alimentação (3) conectada a fonte de iluminação feita por um LED (4) localizado abaixo da mecânica de movimentação x,y (5). As imagens do vaso dorsal são projetadas por meio de uma objetiva (6) de 6,3 X de aumento na CCD (7). Os pulsos elétricos são visualizados em osciloscópio (painel B 8) provenientes do estimulador (painel B 9). Por fim, vídeos do vaso dorsal são visualizados no computador como mostra o painel C 10 após aquisição do sinal gerado pela CCD. 24

Figura 12 - Intensidade luminosa de cada *pixel* da linha de um sinal de vídeo durante a diástole, com a janela fixa W-T (A) e com a implementação da janela móvel X-Y (B). A região entre os círculos em (A) corresponde a intensidade luminosa das regiões mais iluminadas (lúmen do vaso dorsal) e em (B) é ilustrada a janela móvel X-Y. O traçado pontilhado, paralelo ao eixo das abscissas, mostra o limiar. (C) e (D) ilustram uma comparação qualitativa entre os métodos com W-T e X-Y, respectivamente. 25

Figura 13 - Atividade contrátil do vaso dorsal. Em (A) é ilustrado um quadro do vaso dorsal na diástole. A região entre os círculos da janela móvel X-Y é o lúmen. (B) amplitude de contrações ao longo do tempo. Em (C) o mesmo quadro do vídeo de (A) com a região que simula o fotosensor (quadrado cinza). (D) ilustra a atividade contrátil do vaso dorsal com uso do programa de cálculo da média da intensidade luminosa de todos os *pixels* da região do quadrado. 26

Figura 14 – (A) Um ajuste linear entre os métodos que simulam o fotosensor (online) e o que estima o diâmetro do lúmen (offline). Estão mostrados os pontos experimentais (círculos) e a reta do ajuste (traçado contínuo) com $R^2 = 0,94$. (B) Ajustes lineares (com $R^2 > 0,90$) entre os dois métodos desenvolvidos em Matlab 6.5. Os dois métodos foram

normalizados pelo máximo. Seus coeficientes angulares e lineares médios foram $1,03 \pm 0,03$ e $-0,04 \pm 0,02$, respectivamente. O traçado pontilhado em (B) ilustra esta regressão linear média. (C) ilustra o ajuste linear médio (curva média) e seus intervalos de confiança (IC1 e IC2). Os ajustes lineares para IC1 e IC2 foram $1,11x+0,01$ e $0,95x-0,08$, respectivamente. O traçado pontilhado ilustra um ponto próximo a um valor de 0,6 com um erro aproximado de 15 a 17 %..... 27

Figura 15 – Simulação do fotosensor. Em (A) e (B) são ilustrados quadros de duas preparações biológicas e nestes quadros está inserida a região quadrada simulada do fotosensor (área cinza). Em (C) e (D) os histogramas referentes à área que corresponde aos fotosensores de (A) e (B), respectivamente. Em (E) e (F) são apresentados registros da média da intensidade luminosa, ao longo do tempo, referentes às preparações biológicas de (A) e (B), respectivamente..... 28

Figura 16 – Relação entre $[Ca^{2+}]_o$ e a frequência espontânea do vaso dorsal. A linha contínua ao ajuste, por regressão não-linear, dos pontos experimentais com uma função exponencial crescente ($R^2 = 0,98$ e $k = 0,89$)..... 29

Figura 17 – Curva intensidade-duração no coração do inseto *T. molitor*. A linha pontilhada indica a curva aproximada por regressão não-linear da equação Weiss-Lapicque. E_{rh} encontrado foi de $6,34 \pm 0,58$ V, $c = 0,55 \pm 0,07$ ms e $R^2 = 0,88$. A linha contínua é a ligação dos pontos..... 31

Figura 18 - Amplitude de contrações do vaso dorsal do *T. molitor* na presença de $[Ca^{2+}]_o$ 1,0 mM. Atividade miogênica espontânea (10 primeiros segundos, aproximadamente 0,5 Hz) e na presença da frequência controlada por estimulação elétrica (início apontado pela seta) a 1,5 Hz. 31

Figura 19 – (A) Amplitude de contrações (μm) do vaso dorsal em sua frequência espontânea (esp, $\sim 0,5$ Hz) e submetidos à frequências superiores (1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 Hz). (B) Porcentagem de amplitude de contrações em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal, submetido a $[Ca^{2+}]_o$ de 1,0 mM, em diferentes frequências. Os dados apresentaram distribuição normal, e foram submetidos à análise de variância monofatorial ($n = 6$). O asterisco e a cerquilha indicam diferença significativa ($p < 0,05$). 33

Figura 20 - (A) Resposta inotrópica positiva do vaso dorsal para diferentes $[Ca^{2+}]_o$. (B) Os dados foram submetidos à análise de variância monofatorial. O teste de comparação múltipla de Bonferroni revelou diferença significativa entre as porcentagens de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico em $[Ca^{2+}]_o$ de 0,5 e 8,0 mM ($p < 0,05$). 34

Figura 21 – Amplitude de contrações do vaso dorsal ao longo de todo protocolo experimental para estudo do efeito inotrópico da cafeína. (A)- amplitude de contrações espontâneas, (B)- sob estimulação de 1,0 Hz e (C)- ilustra, sob estimulação de 1,0 Hz, a amplitude sob influência de Caff-10. 35

Figura 22 - (A) apresenta a resposta inotrópica negativa do vaso dorsal, quando estimulado em 1,0 Hz, frente a Caff-10. (B) ilustra a diferença significativa entre porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico do vaso dorsal na condição controle e nos corações perfundidos com cafeína..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência espontânea (média \pm erro padrão da média, bpm) do vaso dorsal em distintas $[Ca^{2+}]_o$	29
Tabela 2 – Tensão limiar (média \pm erro padrão, V) necessária para estimular o vaso dorsal em uma dada duração (ms). A frequência estimulatória foi de 1,5 Hz e $[Ca^{2+}]_o$ de 4,0 mM.	30
Tabela 3 – Amplitude de contrações (média \pm EPM, μ m) e da porcentagem da redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal submetido a diferentes frequências.	32
Tabela 4 - Amplitude de contrações (μ m, média \pm EPM) e porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal quando submetido a diferentes $[Ca^{2+}]_o$	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_i$ – concentração citosólica de Ca^{2+} livre
- $[Ca^{2+}]_o$ – concentração externa de Ca^{2+}
- Caff-10 – concentração de 10 mM de cafeína
- CICR - *Calcium Induced Calcium Release*
- CCD - *charge coupled device*
- FR - liberação fracional de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático
- $I_{Ca,L}$ – corrente de Ca^{2+} por canais de membrana de Ca^{2+} do tipo-L
- LED – *Light emitting diode*
- NCX – trocador Na^+/Ca^{2+}
- PA – potencial de ação
- R^2 – Coeficiente de regressão
- RFF – relação de força-frequência
- RS - retículo sarcoplasmático
- RyR – receptor de rianodina
- SERCA – ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

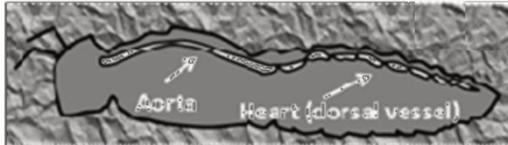
Em grande parte dos vertebrados o sistema circulatório tem como principal órgão propulsor do sangue, o coração. Um septo o divide em dois compartimentos, um direito que recebe sangue dos tecidos para oxigenação e outro esquerdo que recebe sangue oxigenado e o impulsiona para o organismo. Cada compartimento possui duas câmaras com um átrio e um ventrículo separados por válvulas (Silverthorn, 2009). A atividade elétrica dispara a atividade contrátil, que se inicia pela geração de potenciais de ação (PA) em células auto-excitáveis acopladas a um sistema de condução especializado (Malmivuo & Plonsey, 1995). O sincronismo entre atividade elétrica e contrátil permite o bombeamento eficiente, sob pressão adequada, para toda circulação (Katz, 2005).

Nos artrópodes, particularmente na classe *Insecta*, a hemolinfa circula em um sistema aberto. Entre suas principais funções estão o transporte de dióxido de carbono (CO₂), transporte de nutrientes, hormônios e enzimas. É a principal fonte do carboidrato (dissacarídeo) trealose, abundante em insetos, do qual a glicose é extraída a partir da clivagem do dissacarídeo pela enzima trealase (Lopes & Villela, 1972). A hemolinfa é um estoque importante de fluidos. Exerce importante papel na manutenção da temperatura do animal evitando o desenvolvimento de altas temperaturas e o congelamento em temperaturas extremamente baixas (Zachariassen, 1985). Sua composição é de 90% de água e 10% de solutos inorgânicos e orgânicos como proteínas e lipoproteínas. O seu pH varia tipicamente entre 6 e 7,5 (Nation, 2008). A hemolinfa não apresenta como função essencial o transporte como oxigênio, que é feito pelo sistema traqueal que entrega oxigênio diretamente aos tecidos (Hertel & Pass, 2002; Nation, 2008).

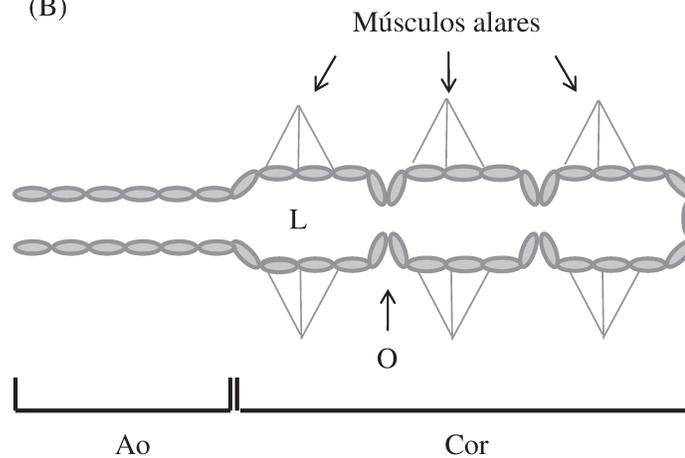
O principal órgão propulsor da hemolinfa nos insetos é o vaso dorsal. Enquanto para vertebrados o coração se localiza na região ventral, nos insetos o coração está localizado na região dorsal (Bishopric, 2005) como ilustra a Figura 1 A. Em geral, mas há exceções como por exemplo na *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830, *Diptera: Drosophilidae*) (Choma *et al*, 2011), o vaso dorsal não possui câmaras, septos ou válvulas (Bishopric, 2005). Sua estrutura tubular é dividida em uma região mais cefálica, a aorta, e outra mais abdominal, o coração (Figura 1 B). Este por sua vez, tem sua constituição muscular composta por miócitos em arranjo helicoidal e por outras fibras, como os músculos alares na cavidade abdominal que se inserem longitudinalmente no vaso dorsal, oferecendo sustentação e contribuição no estabelecimento do diâmetro diastólico do

coração (Nation, 2008). A hemolinfa é tipicamente admitida para o lúmen do vaso através de pares de óstios que se abrem durante o relaxamento (diástole) e é impulsionada para a aorta durante a fase de sístole (Nation, 2008). Assim, a hemolinfa é bombeada para as cavidades lacunares que constituem a hemocele. A Figura 1 C ilustra o processo de propulsão da hemolinfa nos insetos.

(A)



(B)



(C)

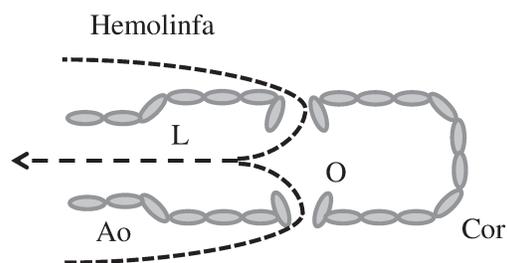


Figura 1 - (A) Coração (heart) e aorta (modificado de Bassani *et al.*, 2010). (B) divisão anatômica do vaso dorsal (coração-Cor e aorta-Ao), lúmen do vaso (L). Na porção mais abdominal, O (seta) ilustra um dos pares de óstios por onde hemolinfa é admitida. Nas regiões adjacentes aos diversos segmentos, os músculos alares oferecem suporte e podem ter papel na abertura do coração. (C) Processo de propulsão da hemolinfa da região mais abdominal para mais cefálica.

No presente trabalho, decidiu-se estudar o vaso dorsal do *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758, *Coleoptera: Tenebrionidae*) (Figura 2). Trata-se de um inseto cuja colônia é de fácil manutenção, não se trata de animal peçonhento ou de difícil manipulação experimental. A espécie passa por quatro estágios em seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa, e adulto. Com um ciclo total de vida de cerca de 6 a 12 meses, os insetos adultos duram cerca de 100 dias. Após término da metamorfose o animal adulto é de cor castanha, tornando-se preto ao final de 5 dias com élitro perfeitamente formado e já com rigidez estabelecida (Figura 2). Cada fêmea põe de 500 a 1000 ovos o que faz com que a população se multiplique muito rapidamente.



Figura 2 - Estágio adulto do coleóptero *Tenebrio molitor*.

O *T. molitor* é uma das espécies que podem infestar alimentos estocados (Vargas & Almeida, 1992; Matías *et al.*, 2003). Não é simples conferir proteção aos alimentos por meio de métodos que não coloquem em risco o ambiente, os consumidores ou que não promovam a extinção da espécie. O nível de dano econômico das infestações é calculável (Gullan & Cranston, 2007) e vem sendo abordado sob o ponto de vista quantitativo (Santos *et al.*, 2002).

O inseto *T. molitor* é uma espécie que habita ambientes de baixa iluminação. Dados eletrofisiológicos revelam, contudo, que o olho composto deste animal pode discriminar cores no espectro visível (Yinon, 1970). Buscar evidências de que o inseto *T. molitor* apresente algum comportamento compatível com a discriminação de

comprimentos de onda específicos contribui para o desenvolvimento de táticas de proteção de alimentos à infestação de insetos por meio de repulsão ou atração por luz.

Não se pode esquecer, contudo, que larvas de *T. molitor* são frequentemente utilizadas para alimentação de peixes e aves, podendo constituir complemento alimentar importante para estes animais. O conhecimento da fisiologia, dos hábitos e de aspectos comportamentais da espécie (e.g. comportamento sexual, visando entender fatores que possam dificultar a sua proliferação) (Wanto & Fischer, 2005) pode ser de grande valia no seu controle.

O conhecimento mais aprofundado da fisiologia desta espécie, além das razões elencadas acima (e.g. científicas, comerciais, ambientais), é importante para aplicação no ensino de fisiologia (Bassani *et al.*, 2010) em particular para equipes de Engenharia Biomédica as quais, tipicamente, não dispõem de biotério para manutenção de vertebrados e em particular de mamíferos. O uso de insetos no ensino (Bassani *et al.*, 2010) pode ocupar um papel muito importante também no chamado princípio dos 3r (*replace, reduce and refine*) que tem internacionalmente norteado o bom uso de animais para a finalidade de pesquisa.

O vaso dorsal pode se tornar um novo modelo para estudo da fisiologia do coração e tem sido proposto como um modelo mais simplificado para estudo do desempenho do coração em condições fisiológicas ou nas doenças (Ocorr *et al.*, 2007; Choma *et al.*, 2011; Wolf, 2012).

Por possuírem ciclo de vida mais curto que vertebrados, os insetos, surgem como um modelo para manipulação gênética importante para se estudar, por exemplo, quais genes influenciam a função cardíaca nos diferentes estágios do seu ciclo de vida e como estes genes são expressos (Choma *et al.*, 2011; Nishimura *et al.*, 2011). Um exemplo é o KCNQ1 que expressa os canais de potássio (K^+) dependentes de ATP, envolvidos na fase de repolarização do potencial de ação humano. Redução na expressão do homólogo deste gene na *D. Melanogaster* (KCNQ) gera disfunções cardíacas, incluindo arritmias (Ocorr *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2011). Além destas razões, a preparação experimental do coração isolado de inseto é simples e nela se pode estudar os efeitos potenciais de agentes que afetam os parâmetros tais como a frequência espontânea (atividade cronotrópica) (Feliciano *et al.*, 2011; Slama, 2012) ou a amplitude das contrações, como medida indireta da atividade inotrópica, por meio de uma instrumentação adequada.

Apesar de sua estrutura anatômica ser distinta da encontrada nos mamíferos e os aspectos fisiológicos não terem sido ainda muito explorados, o automatismo do vaso dorsal apresenta características similares às encontradas nos vertebrados (Hertel & Pass, 2002).

O coração do *T. molitor* é miogênico (Markou & Theophilidis., 2000), ou seja, a atividade elétrica é gerada no próprio músculo com subseqüentes contrações espontâneas, como em várias outras espécies estudadas (McCann, 1963; Hertel & Pass, 2002; Johnson *et al.*, 2002), e existe uma aparente coordenação contrátil ocorre entre as regiões do coração e aorta. Não há um consenso sobre quais estruturas estão envolvidas na geração desta atividade marcapasso (Hertel & Pass, 2002), contudo tem sido relatado que a onda de depolarização no vaso dorsal se inicia na porção mais caudal do coração e é conduzida célula-a-célula por acoplamento via discos intercalares para a aorta (Markou & Theophilidis; 2000, Hertel & Pass, 2002; Nation, 2008).

A atividade cronotrópica do vaso dorsal pode sofrer alterações quando o tecido é exposto à mudanças na temperatura (Jennings *et al.*, 2009), diferenças na concentração iônica do meio (Markou & Theophilidis, 2000; Nation, 2008; Feliciano *et al.*, 2011), neurotransmissores (Hertel & Pass, 2002; Nation, 2008) e agentes humorais (Marciniak *et al.*, 2007; Szymanowska *et al.*, 2008).

A 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) é capaz de aumentar a atividade cronotrópica na *D. melanogaster* (Nichols, 2006) e no *T. molitor* (Feliciano *et al.*, 2011). A atividade cronotrópica é também aumentada no coração de *T. molitor* por agentes humorais (Wasielewski *et al.*, 2008).

Em mamíferos, a modulação por agentes que aumentam a atividade cronotrópica ocorre em condições em que alto consumo energético é requerido e o débito cardíaco aumenta, provocando o aumento do volume de sangue ejetado para circulação a cada minuto como ilustra a equação 1 (Silverthorn, 2008).

$$DC \text{ (L/minuto)} = \text{Frequência cardíaca (batimentos/minuto)} \times VS \text{ (L/batimento)} \text{ (Eq.1)}$$

Da Silva *et al.* (2011) estimaram o aumento de débito cardíaco, no inseto *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758, *Orthoptera: Acrididae*), com aumento da concentração de 1 nM para 100 nM de peptídeo cardioativo de crustáceo. Ecocardiografia de larva de *D. melanogaster* revelou um débito cardíaco normalizado pela sua massa de 100

ml/minuto/kg. Este dado é muito semelhante ao encontrado no humano adulto (70 ml/minuto/kg) (Choma *et al.*, 2011). Medições da atividade cronotrópica e inotrópica por Papaefthimiou & Theophilidis (2011) demonstraram que uma regulação neuronal por β ,4-dihidroxifenetilamina (octopamina) na *Apis mellifera macedonica* (Ruttner, 1988, *Hymenoptera: Apidae*), em condições em que se requer uma alta demanda energética (e.g. exemplo nos vôos longos), aumenta atividade cronotrópica e atividade inotrópica. Bassani *et al.* (2010) também demonstraram (sem o controle de frequência) que serotonina aumenta ambas as atividades. Os dados acima são compatíveis com a idéia de que a regulação do débito cardíaco no inseto apresenta como fundamentais os mesmos parâmetros apresentados na equação 1, ou seja, a frequência e o volume sistólico que fundamentalmente depende da atividade inotrópica.

Nos mamíferos, vários mecanismos envolvidos nas alterações da atividade inotrópica estão ligados ao transporte e regulação de Ca^{2+} (Figura 3). Durante o PA, Ca^{2+} entra no miócito através de canais dependentes de tensão do sarcolema, ligando-se aos canais de liberação (também chamados de receptores de rianodina, RyR) de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) e assim provocando a liberação maciça do íon da organela. O RS é a organela que contém o maior estoque de Ca^{2+} do citoplasma, usado para a contração. O aumento de cerca de 10 vezes na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) leva à ligação do íon à troponina C dos miofilamentos, disparando o encurtamento da célula e conseqüente geração de força (Bers, 2001). Esta dependência do Ca^{2+} do meio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) para liberação de Ca^{2+} do RS, induzida pela entrada de Ca^{2+} via canais de membrana é denominada *Calcium Induced Calcium Release* (CICR) (Fabiato, 1983) e é um mecanismo intrínseco do processo de acoplamento excitação-contração no coração de vertebrados (Bers, 2001).

O relaxamento ocorre quando $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é reduzido pelo transporte por meio de 2 mecanismos rápidos: recaptção de Ca^{2+} para o RS pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a) e extrusão de Ca^{2+} da célula via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e 2 mecanismos mais lentos: extrusão pela ATPase de Ca^{2+} do sarcolema e pelo transporte (pelo uniporter mitocondrial de Ca^{2+}) para o interior da organela (Bassani *et al.*, 1992, Bassani *et al.*, 1994). A série de eventos desde o disparo do PA até a conseqüente geração de força pelo miócito é denominada acoplamento excitação-contração.

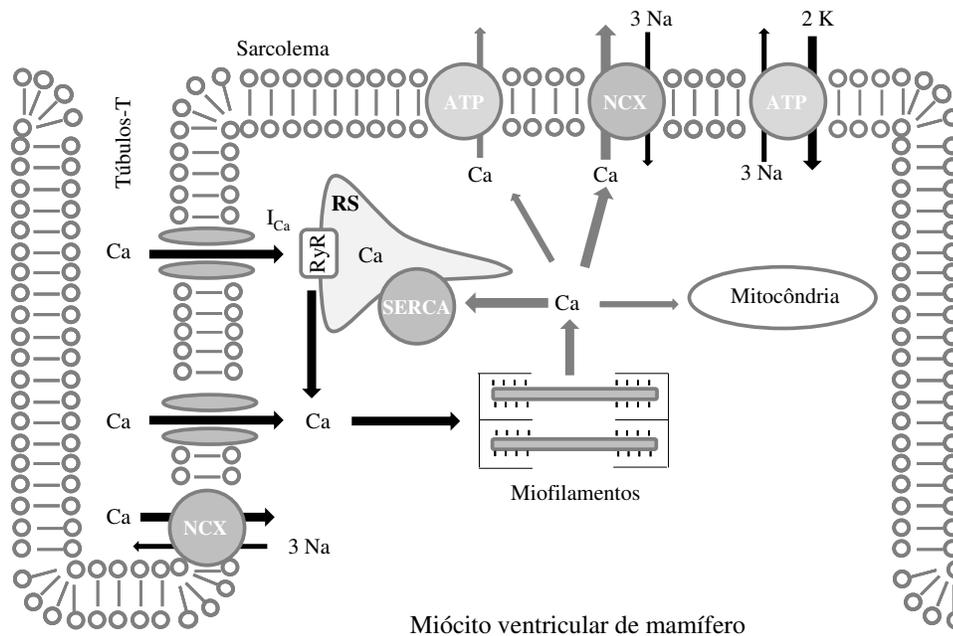


Figura 3 - Esquema geral do transporte de Ca^{2+} no miócito cardíaco e principais mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração e relaxamento do músculo cardíaco.

Os músculos nos insetos são essencialmente estriados e como tais incluem a estrutura contrátil baseada em sarcômeros exibindo miofilamentos que em geral constituem o principal *buffer* de Ca^{2+} do citosol (Nation, 2008). Genes que expressam o NCX já foram identificados em *D. melanogaster*. O trocador é semelhante ao de humano em número, tamanho e posição na região transmembrana, assim como sua sequência de aminoácidos que é aproximadamente 50% semelhante. O fluxo dos íons ocorre de modo dependente da concentração de Na^{+} do meio externo, mas seu transporte não é, aparentemente, igual ao de vertebrados (Ruknudin *et al.*, 1997). O RS é mais abundante em músculos síncronos rápidos, mas estão presentes também em músculos lentos (como o coração) e até em menor quantidade nos músculos fibrilares (Hagopian & Spiro, 1967; Mc Cann 1970; Takekura & Armstrong, 2002; Nation, 2008). Desta forma, é possível que o transporte de Ca^{2+} seja também importante para a regulação da contração muscular nos insetos, dispondo de mecanismos baseados nos mesmos elementos básicos. Os papéis do RS e da concentração externa de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) já foram descritos como importantes no controle da atividade marcapasso do *T. molitor* (Feliciano *et al.*, 2011).

A relação força-frequência (RFF) é um importante mecanismo intrínseco de regulação da atividade inotrópica (Berne & Levy; Endo, 2004) e difere entre as espécies (Pieske *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000; Endo, 2004). No coração de mamíferos como o coelho, assim como no coração humano, a RFF é positiva, ou seja a força de contração aumenta com o aumento da frequência, na faixa de 1,0 até 2,5 Hz, enquanto que no coração do rato e no coração humano insuficiente RFF é negativa na mesma faixa. Aparentemente, não há dados na literatura que descrevam a RFF em insetos. A ação de agentes de efeito inotrópico não é independente da frequência. Assim, a possibilidade de se obter uma RFF para se conhecer seu comportamento e para possibilitar o estudo da ação de agentes inotrópicos torna-se muito importante.

Em vertebrados, $[Ca^{2+}]_o$ produz efeitos cronotrópico e inotrópico positivos (Koch-Weser & Blinks, 1963; Bers, 2001; Maltsev *et al.*, 2006). A principal fonte do Ca^{2+} para contração é o RS. Quanto maior a carga do íon no RS maior a liberação a cada contração (Bassani *et al.*, 1995) e conseqüentemente maior a força desenvolvida pelo músculo cardíaco. Entretanto, a influência de $[Ca^{2+}]_o$ e do RS na atividade inotrópica no vaso dorsal ainda não foi estudada, talvez pela dificuldade técnica de se controlar a frequência em uma estrutura espontaneamente ativa.

No presente trabalho, desenvolvemos metodologia (instrumentação e software) para estudar a atividade inotrópica do vaso dorsal. Com esta metodologia estudamos, além da RFF, duas intervenções inotrópicas: mudanças na $[Ca^{2+}]_o$ e alteração da carga de Ca^{2+} do RS pela aplicação de cafeína.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

- Desenvolver instrumentação para estimar o diâmetro luminal do vaso dorsal (coração) do *T. molitor*;
- Estudar a influência da frequência estimulatória, da $[Ca^{2+}]_o$ e da redução da carga de Ca^{2+} do RS com cafeína, sobre a redução do diâmetro luminal (amplitude de contrações) do vaso dorsal.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv) do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP. Embora não exista obrigatoriedade de parecer da Comissão de Ética no uso de animais para estudo de invertebrados, segundo a legislação brasileira, todos os cuidados foram tomados para evitar sofrimento aos animais e/ou uso no número exagerado de insetos.

Os animais foram mantidos em recipientes plásticos com aeração, a temperatura 25 °C, umidade relativa de aproximadamente 65% e fotoperíodo 12C:12E. Foram utilizados insetos adultos de ambos os sexos, alimentados com batata, cenoura e farelos de trigo e milho.

3.2-Solução Fisiológica

Todas as soluções fisiológicas foram preparadas em água deionizada. As concentrações estão expressas em milimolar (mM). Solução “Tenebrio” (TM): 274 NaCl; 19 KCl; 5 Hepes; 5 glicose com seu pH ajustado para 7,0 por NaOH (Wasielowski *et al.*, 2008; Feliciano *et al.*, 2011). CaCl₂ foi adicionado em diferentes concentrações conforme o experimento. Solução TM com 10 mM de cafeína (Caff-10): 274 NaCl; 19 KCl; 4 CaCl₂, 5 hepes; 10 cafeína, 5 glicose com seu pH ajustado para 7,0 por NaOH.

3.3-Preparação biológica

A câmara para dissecação foi construída com uma placa de Petri sobre uma base sólida de alumínio para evitar abruptos movimentos da preparação. Nessa placa, foi adicionado um polímero flexível (borracha de silicone) no qual o animal era fixado com agulhas de acupuntura, de aço inox. A estratégia de se colocar um polímero flexível também se origina da idéia de fixar dois eletrodos de aço inoxidável, para estimulação elétrica e testar a ideia de estimulação para controle de frequência. A preparação foi iluminada por epi-iluminação para se visualizar o tecido, usando uma lupa estereoscópica (D.F.V. Vasconcelos S.A., São Paulo) e assim poder efetuar a cirurgia para exposição do coração.

Os insetos foram anestesiados com éter etílico, decapitados e tiveram os élitros, as pernas e asas removidas. Uma incisão longitudinal no abdômen e tórax foi feita para remoção do trato digestivo, parede dos músculos abdominais e glândulas para expor o vaso dorsal. A preparação consistiu, portanto, do coração, alguns músculos abdominais e a cutícula dorsal.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura de 23 °C.

3.4-Dispositivos e Equipamentos

3.4.1-Set-up para medição da atividade contrátil do vaso dorsal

Uma câmara de perfusão e estimulação foi feita em acrílico transparente com uma lamínula de vidro ao fundo (desenvolvida no CEB-UNICAMP). A cutícula dorsal do inseto foi aderida sobre a lamínula em uma camada fina de vaselina (Vaselina sólida comercial, LabCenter, Campinas-SP-Brasil). O sistema de perfusão (Figura 4 A e B) com fluxo constante de 1 ml/min foi preparado para que o escoamento da solução fosse da região cefálica (aorta) para região caudal (coração). Os estímulos elétricos foram aplicados ao tecido por meio de um par de eletrodos conectados a um estimulador (Figura 4 C), desenvolvido no CEB-UNICAMP, capaz de liberar estímulos na forma de pulsos retangulares de tensão, bipolares, com durações de 1,0 a 64,0 ms e frequência de 0,1 a 10,0 Hz. Os estímulos aplicados foram monitorados, usando um osciloscópio (Figura 4 D, modelo DSO03062A, *Agilent Technologies*). O par de eletrodos de aço inox foi posicionado de lados opostos, no sentido do diâmetro maior, um próximo da aorta e outro, do segundo segmento do vaso dorsal. Isto aparentemente torna a direção de aplicação do campo elétrico aproximadamente coincidente com o eixo maior das células que estão dispostas de modo helicoidal (Nation, 2008).

A câmara de perfusão e estimulação foi colocada sobre o estágio de um microscópio (desenvolvido por adaptação de material existente para o presente trabalho) equipado com sistema de movimentação x,y (Figura 4 E, tipo *charriot*) e sistema para ampliação e focalização da imagem do vaso dorsal. A preparação foi iluminada por um LED (Figura 4 F) conectado a uma fonte de tensão ajustável (*Tetronix*, PS 281). Foram testados LEDs de comprimentos de onda no azul, verde, vermelho e outro com luz branca. Foi utilizado o LED de luz branca com o qual se obteve vídeos com um melhor contraste entre a região do lúmen do vaso dorsal e às regiões adjacentes. A imagem foi projetada através de uma objetiva (Figura 4 G, *Carl Zeiss*, aumento de 6,3 X e plan 0,16;

West Germany) no sensor (CCD, *charge coupled device*) da câmera de vídeo (Figura 4 H, Ikegami, ICD-31). A aquisição dos vídeos gerados pela câmera CCD foi feita por uma placa de captura de vídeo (Figura 1-I, *PinnacleDC10plus*, Motion-JPEG VideoIOBoard) sob controle do programa *Pinnacle Studio* (v 7.15.1), na taxa de 30 quadros/s. Os vídeos foram convertidos para extensão .avi e utilizados para processamento posterior em Matlab 6.5. A Figura 4 ilustra a instrumentação desenvolvida para estudo da amplitude de contrações do coração do inseto.

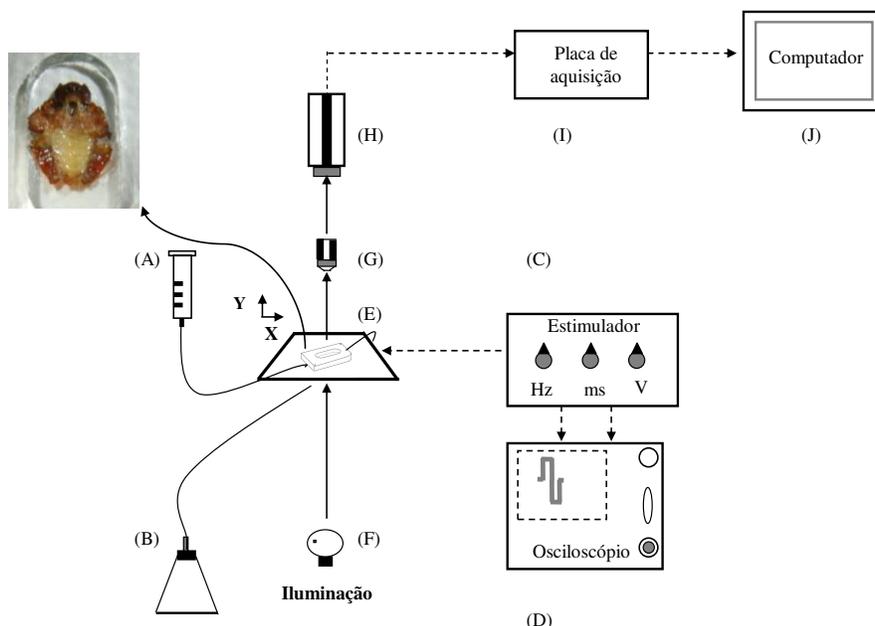


Figura 4 - Esquema da instrumentação desenvolvida para estudo da atividade contrátil do vaso dorsal do inseto (A) seringa com líquido de perfusão; (B) sistema de vácuo; (C) estimulador elétrico; (D) osciloscópio; (E) sistema de movimentação x,y com a câmara de perfusão (ampliação da ilustração da câmara no canto superior esquerdo); (F) iluminação; (G) objetiva; (H) Câmera de vídeo; (I) placa de aquisição de vídeo e (J) computador para exibição e gravação dos vídeos.

3.4.2-Programa de medição do diâmetro luminal do vaso dorsal

Para medir a frequência e a amplitude de contrações do vaso dorsal foi desenvolvido um programa em Matlab 6.5 que mede o diâmetro da região mais clara do vaso dorsal (lúmen). A Figura 5 (A, B e C) ilustra três quadros de um vídeo da contração do vaso dorsal, respectivamente diástole, sístole e diástole. Os traçados pontilhados na Figura 5 (D, E e F) correspondem às intensidades luminosas dos *pixels* de uma linha selecionada que atravessa o lúmen do coração (Figura 5 A, B e C). Quanto maior o valor

de intensidade luminosa, mais claro é o *pixel*. Estes sinais foram filtrados (traçados contínuos na Figura 5 D, E e F) pelo cálculo da média móvel (20 pontos) e, utilizando este sinal filtrado, o programa conta, quadro a quadro, a quantidade de *pixels* com intensidade luminosa acima de um valor pré-estabelecido, ou limiar (linha tracejada paralela ao eixo das abcissas da Figura 5 D, E e F) na janela de análise W-T, a qual deve conter o lúmen. O valor do limiar é inserido pelo usuário e escolhido de forma a distinguir as regiões mais claras, onde se encontra o lúmen, das regiões mais opacas. A quantidade de *pixels* acima do limiar é proporcional ao diâmetro do lúmen.

Nota-se que, na Figura 5 A as paredes mais opacas estão mais distantes da região central do lúmen do que na Figura 5 B, o que significa que, no primeiro caso, a contagem do número de *pixels* acima do limiar é maior. A Figura 5 G ilustra esta mudança na contagem de *pixels* acima do limiar, à medida que ocorre contração e relaxamento do vaso dorsal. As setas 1, 2 e 3 (Figura 5 G) indicam na sequência, o número de *pixels* acima do limiar na janela de detecção W-T, correspondentes a Figura 5 A-D, B-E e C-F, respectivamente. Na Figura 5 H o sinal da Figura 5 G é mostrado invertido.

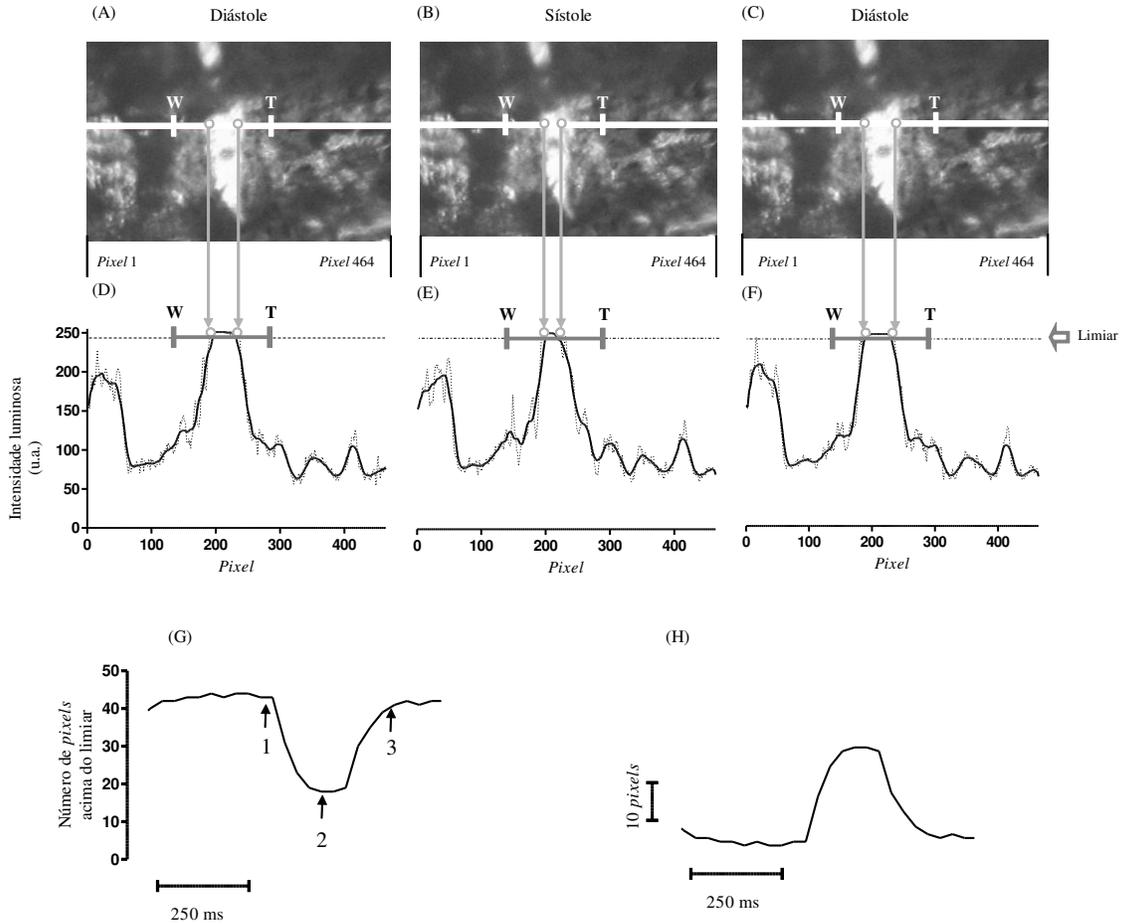


Figura 5 - Dois quadros de um vídeo do vaso dorsal relaxado (A e C, diástole) e um contraído (B, sístole). A linha branca nos quadros A, B e C contém uma janela de análise (W-T) para detecção da largura do lúmen. Em D, E e F são apresentadas as intensidades luminosas de cada pixel da linha selecionada (não filtrado: traçado pontilhado e filtrado: traçado contínuo). A região entre os círculos corresponde ao lúmen (painéis A, B, C, D, E e F). A Figura 5 G ilustra as mudanças na contagem de *pixels* durante a contração do vaso dorsal. A Figura 5-H mostra o sinal visto na Figura 5 G, invertido.

Como há diferença do diâmetro do lúmen em cada linha do sinal do vídeo, foi utilizado um critério de selecionar a linha com maior diâmetro diastólico via inspeção visual e sempre perpendicular à linha central do lúmen. A janela W-T é escolhida pelo usuário de forma a conter a região do vaso dorsal e deve ser a menor possível, para evitar que os *pixels* que estão acima do limiar, mas fora desta janela (círculos da Figuras 6 A e B), sejam computados. Portanto, a janela W-T evita que o diâmetro luminal seja superestimado.

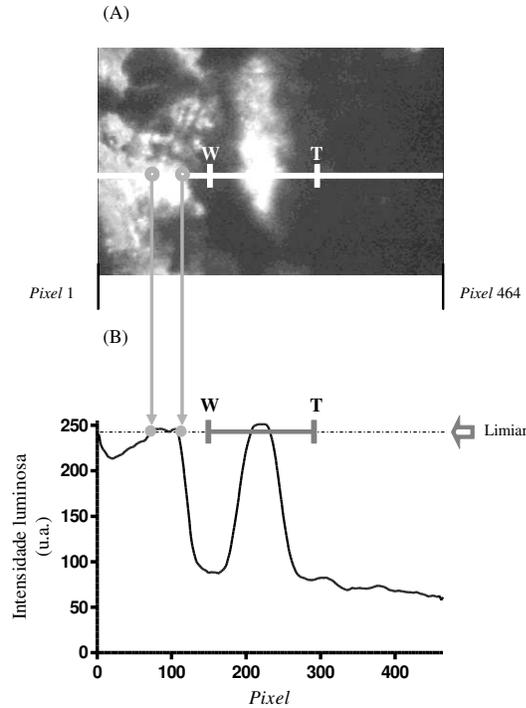


Figura 6 - Vaso dorsal durante a diástole (A, um quadro de vídeo). A região entre os círculos em A mostra uma região com intensidade luminosa idêntica ao do lúmen. O segmento W-T em B mostra a janela de detecção que será imune a *pixels* com intensidades luminosas idênticas ao do lúmen.

Por outro lado, em muitos quadros existem *pixels* com intensidade luminosa acima do limiar (círculo na Figura 7 A) que não compõe a região do lúmen, mas estão dentro da janela W-T de análise (Figura 7 A e B). Portanto, o programa teve que ser refinado de modo que fossem excluídos estes *pixels*. Da mesma forma que o programa anterior, no primeiro quadro do vídeo o programa quantifica o número de *pixels* acima do limiar, dentro de uma janela determinada pelo usuário, a qual deve conter o lúmen (janela W-T das Figuras 7 C e D). A partir da localização do primeiro e último *pixels* acima do limiar, que correspondem ao início e fim do lúmen, cria-se uma nova janela de análise (X-Y da Figuras 7 E e F) para o próximo quadro. Esta nova janela restringe a análise do próximo quadro à uma região, que começa em X, correspondente à localização do primeiro *pixel* acima do limiar (início do lúmen) subtraída de um intervalo, e termina em Y, correspondente à localização do último *pixel* acima do limiar (fim do lúmen) mais o mesmo intervalo. A quantidade de *pixels* acima do limiar é quantificada e uma nova janela de análise é determinada para o próximo quadro do mesmo modo que a anterior. Este processo se repete (7 F e H) até o último quadro.

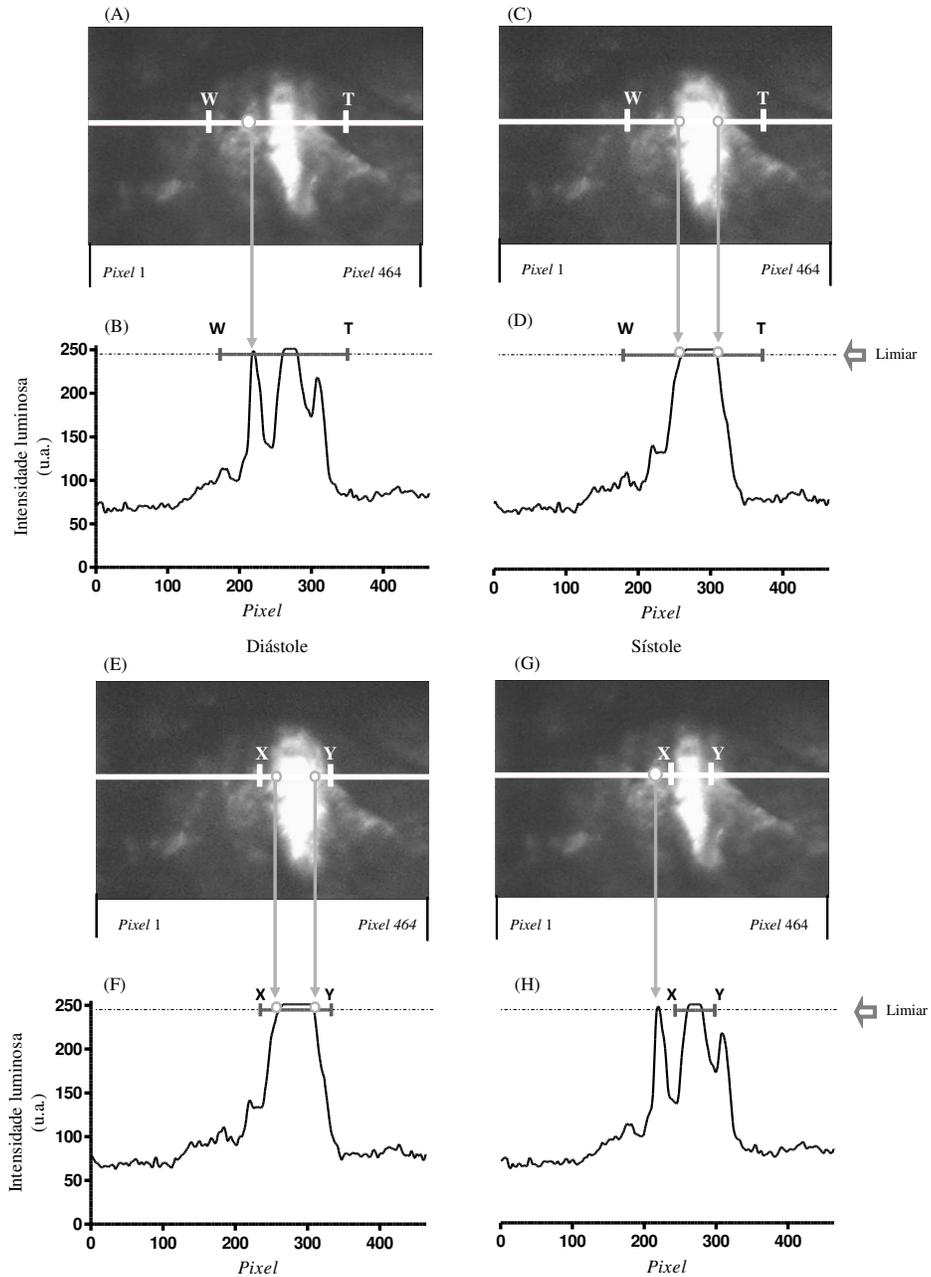


Figura 7- Vaso dorsal durante a sístole, A, e diástole, B. O círculo em A ilustra *pixels* de intensidade luminosa igual, mas que não pertecem ao lúmen (círculos em B). Em A, B, C e D é ilustrado a janela fixa de análise W-T que se torna móvel (X-Y) nos painéis E, F, G e H. Nestes painéis é ilustrada a situação em que a janela móvel X-Y próxima ao lúmen (círculos em E e F) diminui (G e H) de modo a não computar os *pixels* no círculo em G e H. Caso a janela X-Y em G e H fosse do mesmo tamanho em E e F, estes *pixels* fora da região do lúmen seriam computados, e a largura do lúmen superestimada.

Conseqüentemente, a largura da janela X–Y varia de quadro para quadro, conforme o diâmetro do lúmen, tornando esta janela de detecção, ao invés de fixa, móvel, de modo a não computar *pixels* fora da região do lúmen (círculo da Figura 7 G e H). A Figura 8 ilustra como a janela de detecção X–Y varia seu tamanho (situação hipotética).

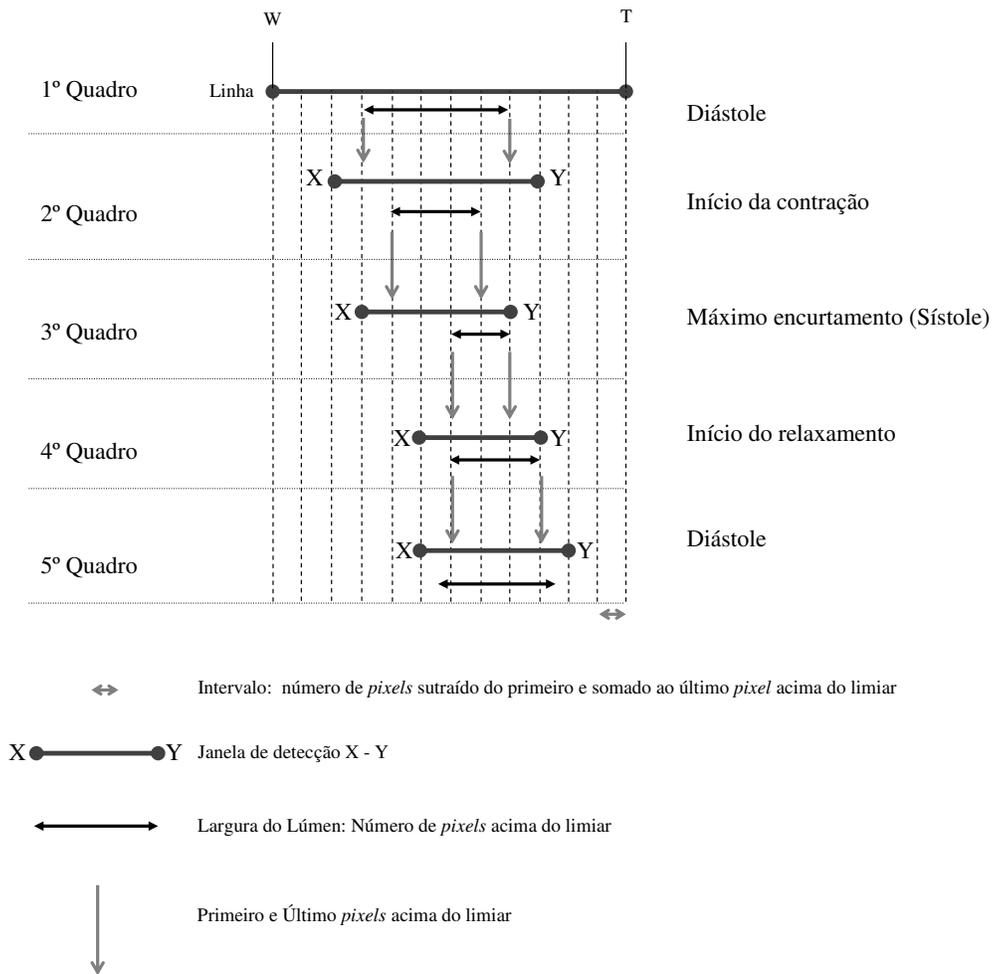


Figura 8- Ilustração da janela de detecção. No primeiro quadro a janela de detecção é fixa (W-T) e o vaso dorsal se encontra na diástole. Conforme ocorra contração e relaxamento do vaso dorsal, o número de *pixels* acima do limiar varia de quadro para quadro, e o tamanho da janela de detecção X-Y também varia.

A quantidade de *pixels* foi convertida para micrômetros com o uso de uma grátula (Carl Zeiss, Göttingen) com marcações micrométricas de 10 μm e tamanho total de 1 mm. A grátula foi colocada no estágio do microscópio e substituiu a câmara com a preparação biológica. Foi gravado um vídeo da grátula e um quadro foi exibido com a utilização do programa desenvolvido em Matlab 6.5. Mediu-se o número de *pixels* que

separam as marcações micrométricas. A proporção foi de 265 *pixels* para 1000 μm (~4 μm para cada *pixel*).

A interface gráfica, construída na função Guide de Matlab 6.5 é apresentada na Figura 9.

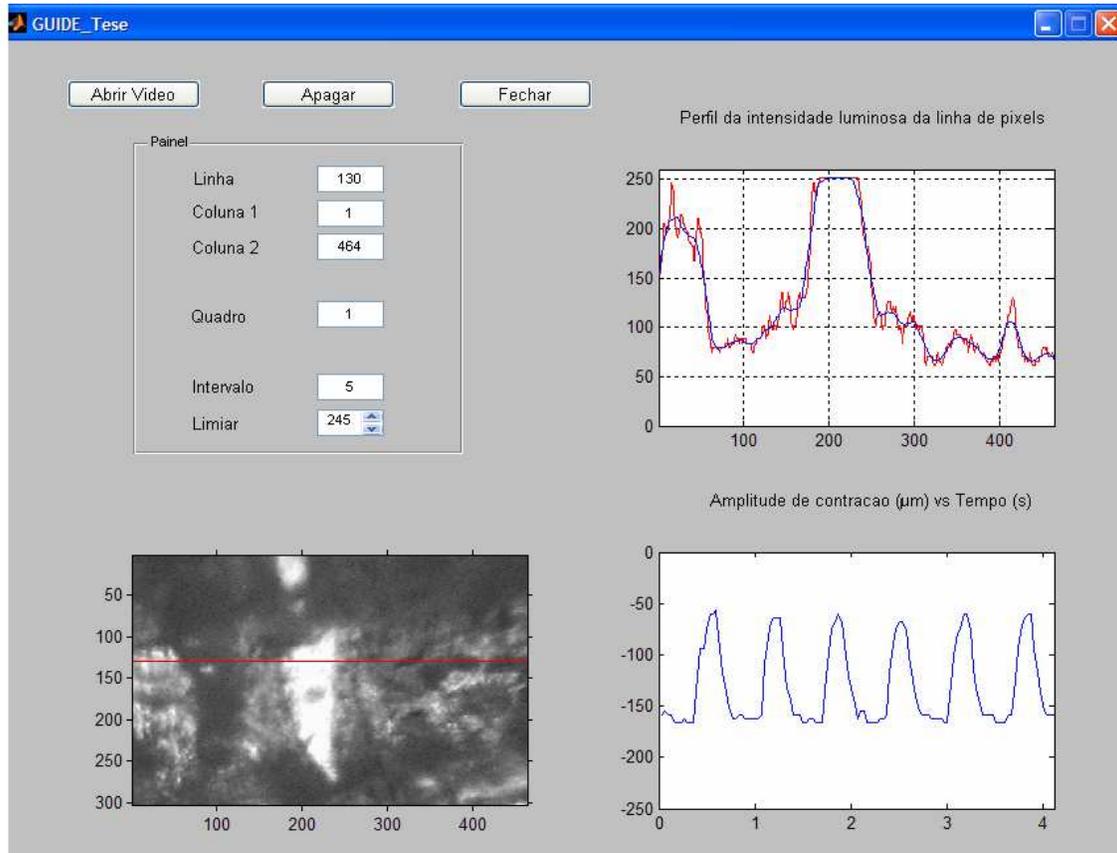


Figura 9- Interface gráfica do programa desenvolvido para medição das amplitudes de contração do vaso dorsal do inseto. Deve-se selecionar a linha, coluna1 (W), coluna2 (T), quadro, o intervalo da janela móvel e o limiar. O programa exibe o quadro com a linha selecionada (canto inferior esquerdo), um vídeo com perfil da intensidade luminosa *pixel* a *pixel* da linha selecionada (canto superior direito) e a amplitude de contrações (valores invertidos) em μm em função do tempo (canto inferior direito).

3.4.3-Simulação de um fotosensor

O método de detecção das amplitudes de contrações com auxílio de vídeos envolve a aquisição de dados com processamento pós-experimento (offline). O ideal é processar e exibir os sinais durante o experimento, e no presente trabalho também foi estudado se os fotosensores que são utilizados para medição da frequência espontânea

do vaso dorsal (Tartes *et al.*, 2002), também teriam uma aplicação para estudo da atividade inotrópica. Isto possibilitaria processamento imediato durante o experimento (online).

Foi desenvolvido um novo programa em Matlab 6.5 que calculou a média da intensidade luminosa em uma área correspondente ao que seria detectado, idealmente, por um fotosensor comercial (OPT 101, Burr-Brown, Tucson, AZ, EUA) com auxílio dos vídeos disponíveis.

A área útil dos vídeos é composta por 304 x 464 *pixels*. Foi feita uma proporção para que 2,28 x 2,28 mm² (área do fotosensor) fosse simulada dentro da área de detecção do sensor CCD (4,8 x 3,6 mm²) da câmera utilizada para obtenção dos vídeos. Com isso, a região simulada nos quadros do vídeo ficou com 200 x 200 *pixels*.

A Figura 10 (A e B) ilustra quadros do vaso dorsal durante a fase de diástole e sístole, respectivamente. Em ambos os quadros estão inseridas as regiões quadradas que simulam o fotosensor. À direita seus respectivos histogramas de frequência de *pixels* com as respectivas intensidades luminosas. Os histogramas demonstram que o quadro do vaso dorsal na sístole possui mais *pixels* de menores intensidades luminosas do que um quadro do vaso dorsal na diástole, e o número de *pixels* mais iluminados é maior na diástole. Grande parcela de *pixels* de maiores intensidades luminosas reside na região do lúmen (região mais clara). O programa calcula a média das intensidades luminosas de todos os *pixels* da área simulada em cada quadro e exibe um gráfico com a média de intensidade luminosa em função do tempo. A média é maior no quadro do vaso dorsal na diástole do que na sístole (Figura 10 C).

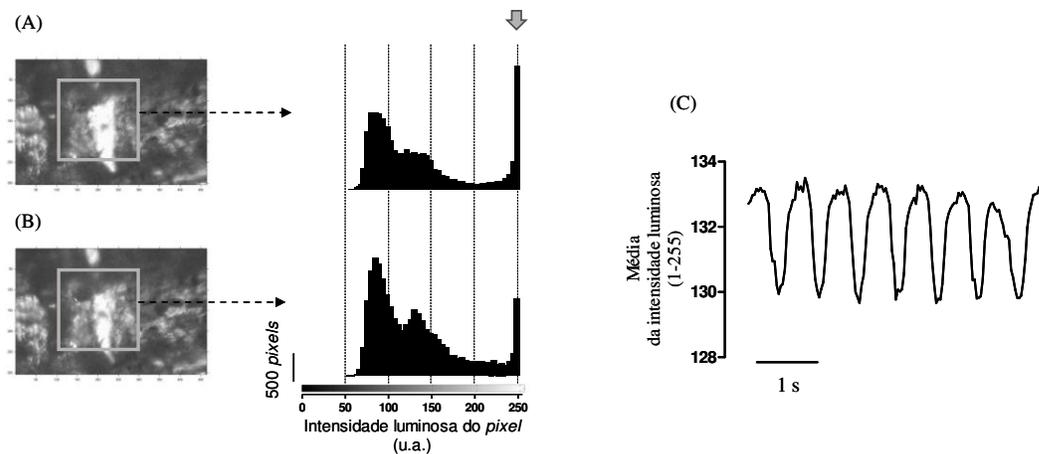


Figura 10 - Em A e B são apresentados quadros com a região que simula o fotosensor e seus histogramas na diástole e sístole, respectivamente. A seta nos histogramas indica o número de *pixels* que compõe a região mais iluminada do sinal de vídeo. Em C é ilustrada a curva média das intensidades luminosas dos *pixels* da região simulada em função do tempo.

3.5- Procedimentos experimentais

3.5.1- Ajuste linear entre os métodos de medição das amplitudes de contração

Foram gravados e aproveitados vídeos com alto contraste entre a região do lúmen e as paredes mais opacas. Para cada vídeo foi medida a atividade contrátil por meio dos dois métodos (online e offline) desenvolvidos e implementados em Matlab 6.5. Ambos os sinais gerados pelos dois programas foram invertidos, normalizados e então feito um ajuste linear.

3.5.2- Resposta cronotrópica a distintas concentrações externas de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$)

Um estudo preliminar importante para o presente trabalho foi encontrar a frequência média espontânea da preparação frente a algum agente inotrópico. Para isso foi estudada a influência de distintas $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (0, 1, 2, 4, 8 e 16 mM) na atividade cronotrópica do coração do inseto. A preparação foi perfundida com concentrações crescentes de Ca^{2+} , iniciando-se pela solução sem o íon. Após a troca de solução de perfusão um período de 5 minutos foi necessário para estabilização da frequência espontânea. O número de

contrações espontâneas por minuto foi registrado por inspeção visual com auxílio de um cronômetro.

3.5.3-Curva intensidade-duração no coração do inseto

Uma maneira de caracterizar a excitabilidade celular é por meio da curva intensidade-duração. Pulsos retangulares de tensão foram aplicados com frequência ligeiramente superior à frequência espontânea média (1,5 Hz) e com diferentes durações de pulso estimulatório (0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0 ms). No início, para a maior duração, a tensão foi gradativamente aumentada até o momento que ocorresse a captura (frequência cardíaca igual à frequência de estimulação). A intensidade da tensão de captura foi tomada como limiar para cada duração. A curva intensidade vs duração foi ajustada pela equação de Weiss-Lapicque para cálculo dos parâmetros de estimulação.

$$E_T(d) = E_{rh} \cdot \left(1 + \frac{c}{d}\right)$$

na qual E_T é a tensão necessária para estimulação com um pulso de duração d , E_{rh} é a tensão de reobase (duração de pulso 'infinita') c é a cronaxia (duração cuja tensão limiar é o dobro da E_{rh}). Neste protocolo a $[Ca^{2+}]_o$ foi de 4,0 mM.

3.5.4-Relação entre a atividade inotrópica e cronotrópica

O vaso dorsal foi colocado na câmara de acrílico no sistema de microscopia e foi perfundido com solução TM contendo $[Ca^{2+}]_o$ de 1,0 mM e mantido durante 10 minutos para estabilização de sua frequência espontânea, tipicamente abaixo de 1,0 Hz (média de $\sim 0,97 \pm 0,18$ Hz). Assim, o tecido foi estimulado nas frequências de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 Hz, portanto acima de sua frequência espontânea. Após 1 minuto de estimulação em cada frequência, foram gravados vídeos do vaso dorsal com duração de 10 s coletados a uma taxa de 30 quadros/s e medida a porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico, usando os traçados obtidos do sistema de detecção do diâmetro luminal desenvolvido no presente trabalho.

3.5.5-Resposta inotrópica a distintas $[Ca^{2+}]_o$ no líquido de perfusão

A preparação biológica foi mantida no líquido de perfusão (solução TM) por 10 min em $[Ca^{2+}]_o$ de 0,5 mM até que sua frequência espontânea se estabilizasse. Para estudar o

efeito de um agente que alterasse a amplitude de contrações, a frequência foi mantida constante pela estimulação com pulsos retangulares de tensão, com frequência fixa próxima da frequência espontânea da maior $[Ca^{2+}]_o$ (8,0 mM) e duração próxima à cronaxia.

Após a estabilização da frequência, foram aplicados estímulos elétricos com frequência de 1,5 Hz durante 10 min em $[Ca^{2+}]_o$ de 0,5 mM, e um vídeo com duração de 10 s foi gravado. O protocolo foi repetido na mesma preparação após troca do líquido de perfusão, aumentando $[Ca^{2+}]_o$ para 2,0 mM ou 8,0 mM. Com auxílio do programa de detecção do diâmetro luminal, foi medida a redução do diâmetro luminal para cada $[Ca^{2+}]_o$ e calculada a porcentagem desta redução em relação ao diâmetro diastólico.

3.5.6- Resposta inotrópica a Caff-10

A preparação biológica foi mantida no líquido de perfusão em solução TM com $[Ca^{2+}]_o$ de 4,0 mM por 10 min, gravado um vídeo e medida sua frequência espontânea. Após este período, a preparação foi estimulada com frequência de 1,0 Hz por 5 min, gravado um vídeo e medida a redução do diâmetro luminal, diâmetro diastólico, porcentagem da redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico e $t_{0,5}$ de relaxamento. Terminada a estimulação, a mesma preparação foi perfundida com a mesma solução, por 5 min e em seguida foi feita troca de solução para Caff-10. Após 5 min foi gravado um vídeo para medição da frequência espontânea. Em seguida, a frequência estimulatória foi estimulada a 1,0 Hz por 5 min e repetido o protocolo de medição dos parâmetros.

3.6-Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. A significância estatística ($p < 0,05$) foi determinada por Análise de variância monofatorial para os experimentos da seção 3.5.4 e 3.5.5, com posterior comparação entre médias pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, utilizando o *software* Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para o experimento da seção 3.5.6 a significância estatística foi determinada pelo teste t-student pareado quando $p < 0,05$.

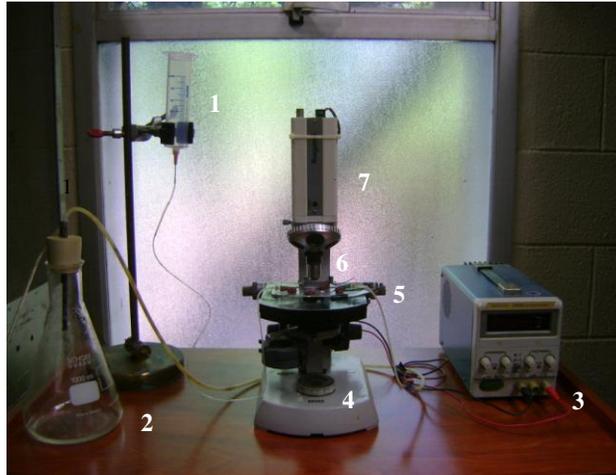
Foi feito um ajuste linear entre os sinais gerados pelos dois métodos online e offline de estudo da atividade contrátil. Foi calculada a média dos coeficientes angulares e lineares, e a diferença destas médias para seus respectivos intervalos de confiança.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

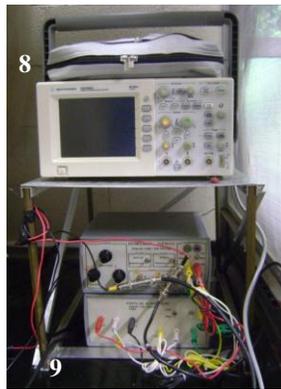
4.1-Instrumentação

A Figura 11 ilustra o sistema desenvolvido. Uma câmara com sensor CCD (Figura 11 A-7) foi adaptada a um sistema de microscopia (Figura 11 A-4-5-6). Nesta microscopia de ampliação de imagem, os vídeos gerados pelo sensor CCD foram transmitidos ao computador por uma placa de captura de vídeo e exibidos com magnificação total na tela do monitor (Figura 11 C-10) de aproximadamente 140 X quando utilizada uma objetiva de 6,3 X. Pulsos elétricos provenientes do estimulador (Figura 11 B-9) foram visualizados no osciloscópio (Figura 11 B-8).

(A)



(B)



(C)



Figura 11 – Montagem da instrumentação para estudo da atividade contrátil do vaso dorsal. O painel (A) mostra a seringa com líquido de perfusão (1), sistema de vácuo (2) e o microscópio com a fonte de alimentação (3) conectada a fonte de iluminação feita por um LED (4) localizado abaixo da mecânica de movimentação x,y (5). As imagens do vaso dorsal são projetadas por meio de uma objetiva (6) de 6,3 X de aumento na CCD (7). Os pulsos elétricos são visualizados em osciloscópio (painel B 8) provenientes do estimulador (painel B 9). Por fim, vídeos do vaso dorsal são visualizados no computador como mostra o painel C 10 após aquisição do sinal gerado pela CCD.

4.2-Software

A Figura 12 A,B ilustra uma comparação da amplitude de contrações do vaso dorsal com o método que estima a largura do lúmen com a janela fixa W-T e com a implementação da janela móvel X-Y. Com a implementação da janela móvel X-Y os *pixels* localizados fora da região selecionada e acima do limiar não foram computados, o que evitou que o diâmetro do lúmen fosse superestimado. A Figura 12 C e 12 D mostram

que os sinais gerados pelo método da janela fixa W-T possuem mais ruídos (pico da amplitude de contrações) do que a janela móvel X-Y.

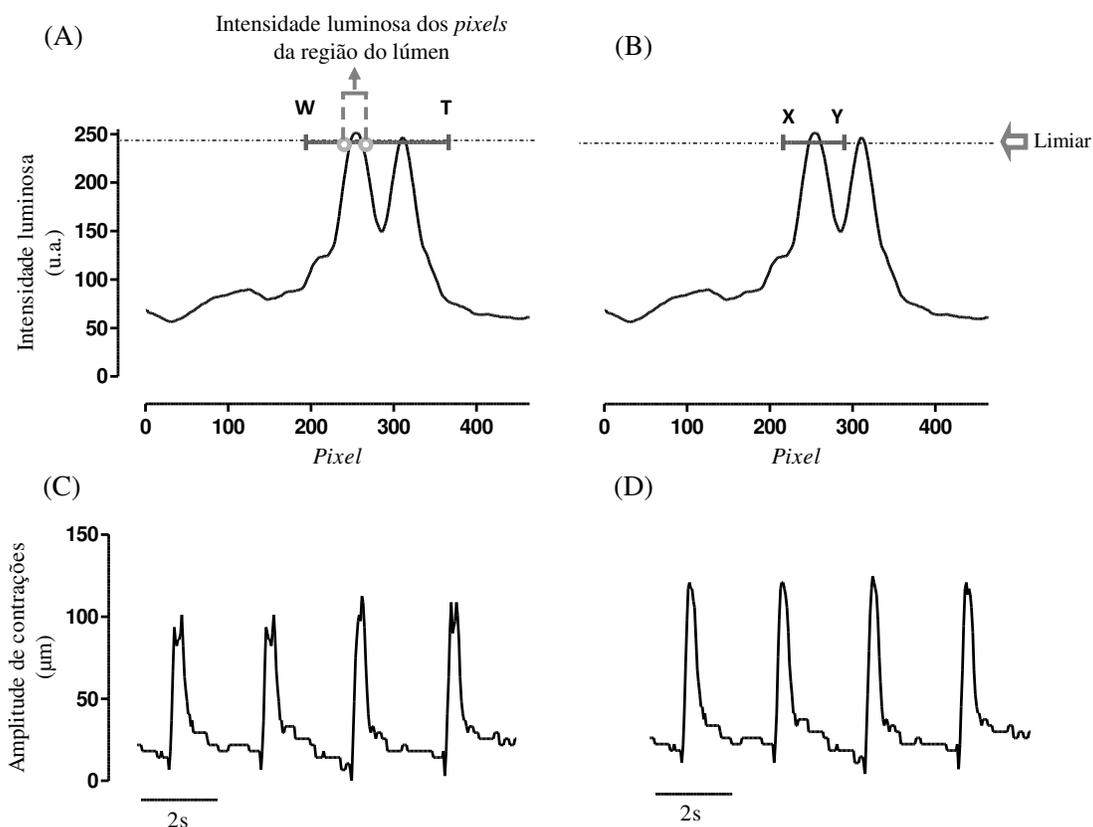


Figura 12 - Intensidade luminosa de cada *pixel* da linha de um sinal de vídeo durante a diástole, com a janela fixa W-T (A) e com a implementação da janela móvel X-Y (B). A região entre os círculos em (A) corresponde a intensidade luminosa das regiões mais iluminadas (lúmen do vaso dorsal) e em (B) é ilustrada a janela móvel X-Y. O traçado pontilhado, paralelo ao eixo das abscissas, mostra o limiar. (C) e (D) ilustram uma comparação qualitativa entre os métodos com W-T e X-Y, respectivamente.

A atividade contrátil foi também estudada pelo cálculo da média da intensidade luminosa dos *pixels* da região que simula do fotosensor. A média desta intensidade luminosa foi maior em um quadro do vaso dorsal na diástole do que na sístole. As Figuras 13 A e 13 B ilustram a atividade contrátil com o método que estima o diâmetro luminal e as Figuras 13 C e 13 D ilustram a atividade contrátil com uso do método que simula o fotosensor.

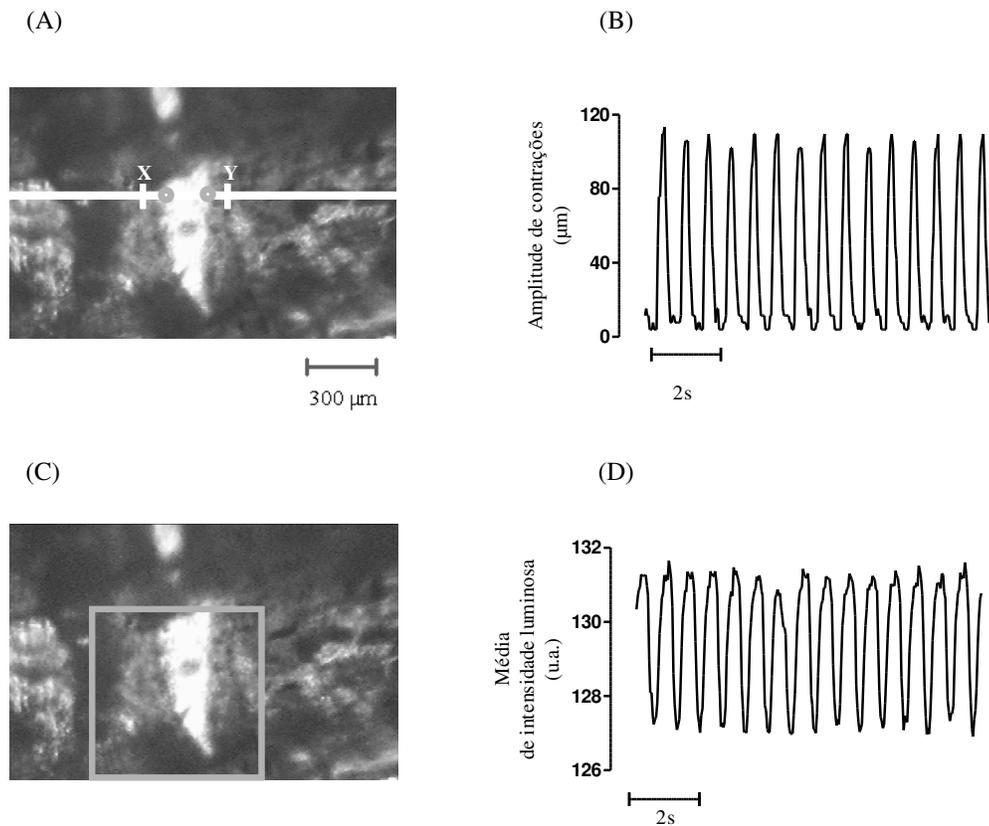


Figura 13 - Atividade contrátil do vaso dorsal. Em (A) é ilustrado um quadro do vaso dorsal na diástole. A região entre os círculos da janela móvel X-Y é o lúmen. (B) amplitude de contrações ao longo do tempo. Em (C) o mesmo quadro do vídeo de (A) com a região que simula o fotosensor (quadrado cinza). (D) ilustra a atividade contrátil do vaso dorsal com uso do programa de cálculo da média da intensidade luminosa de todos os *pixels* da região do quadrado.

Foi feito um ajuste linear entre os sinais gerados pela simulação do sensor em Matlab 6.5 e o programa de medição do diâmetro luminal. As retas dos ajustes com $R^2 > 0,90$ são apresentadas na Figura 14.

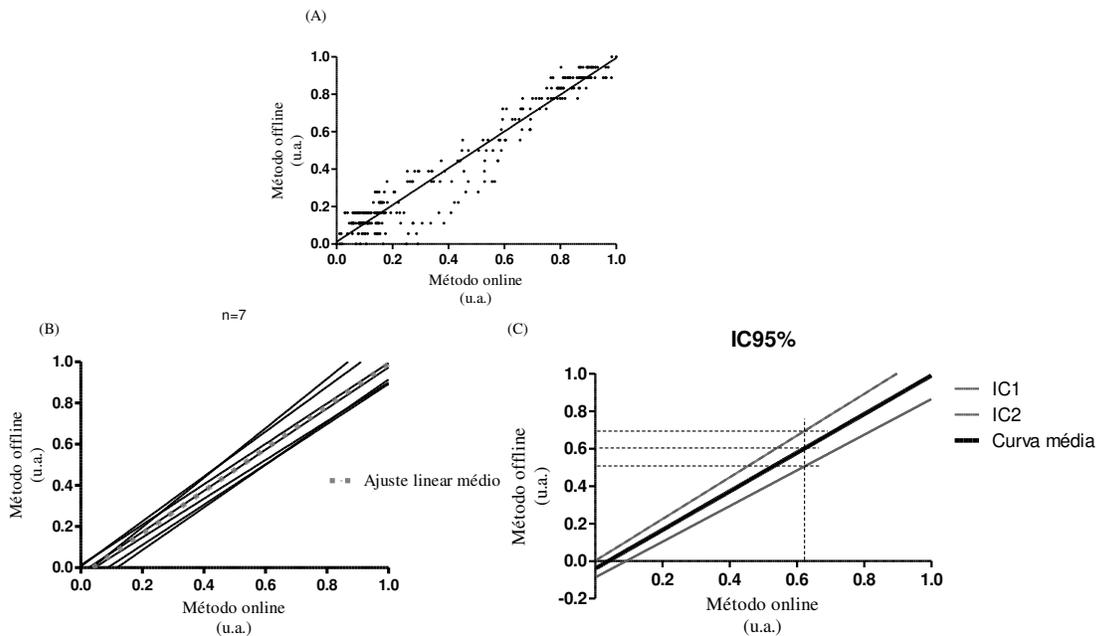


Figura 14 – (A) Um ajuste linear entre os métodos que simulam o fotosensor (online) e o que estima o diâmetro do lúmen (offline). Estão mostrados os pontos experimentais (círculos) e a reta do ajuste (traçado contínuo) com $R^2 = 0,94$. (B) Ajustes lineares (com $R^2 > 0,90$) entre os dois métodos desenvolvidos em Matlab 6.5. Os dois métodos foram normalizados pelo máximo. Seus coeficientes angulares e lineares médios foram $1,03 \pm 0,03$ e $-0,04 \pm 0,02$, respectivamente. O traçado pontilhado em (B) ilustra esta regressão linear média. (C) ilustra o ajuste linear médio (curva média) e seus intervalos de confiança (IC1 e IC2). Os ajustes lineares para IC1 e IC2 foram $1,11x+0,01$ e $0,95x-0,08$, respectivamente. O traçado pontilhado ilustra um ponto próximo a um valor de 0,6 com um erro aproximado de 15 a 17 %.

A Figura 15 ilustra diferenças em duas preparações biológicas, em seus respectivos histogramas e nos valores encontrados na média da intensidade luminosa dos *pixels* que compõe a região simulada pelo fotosensor.

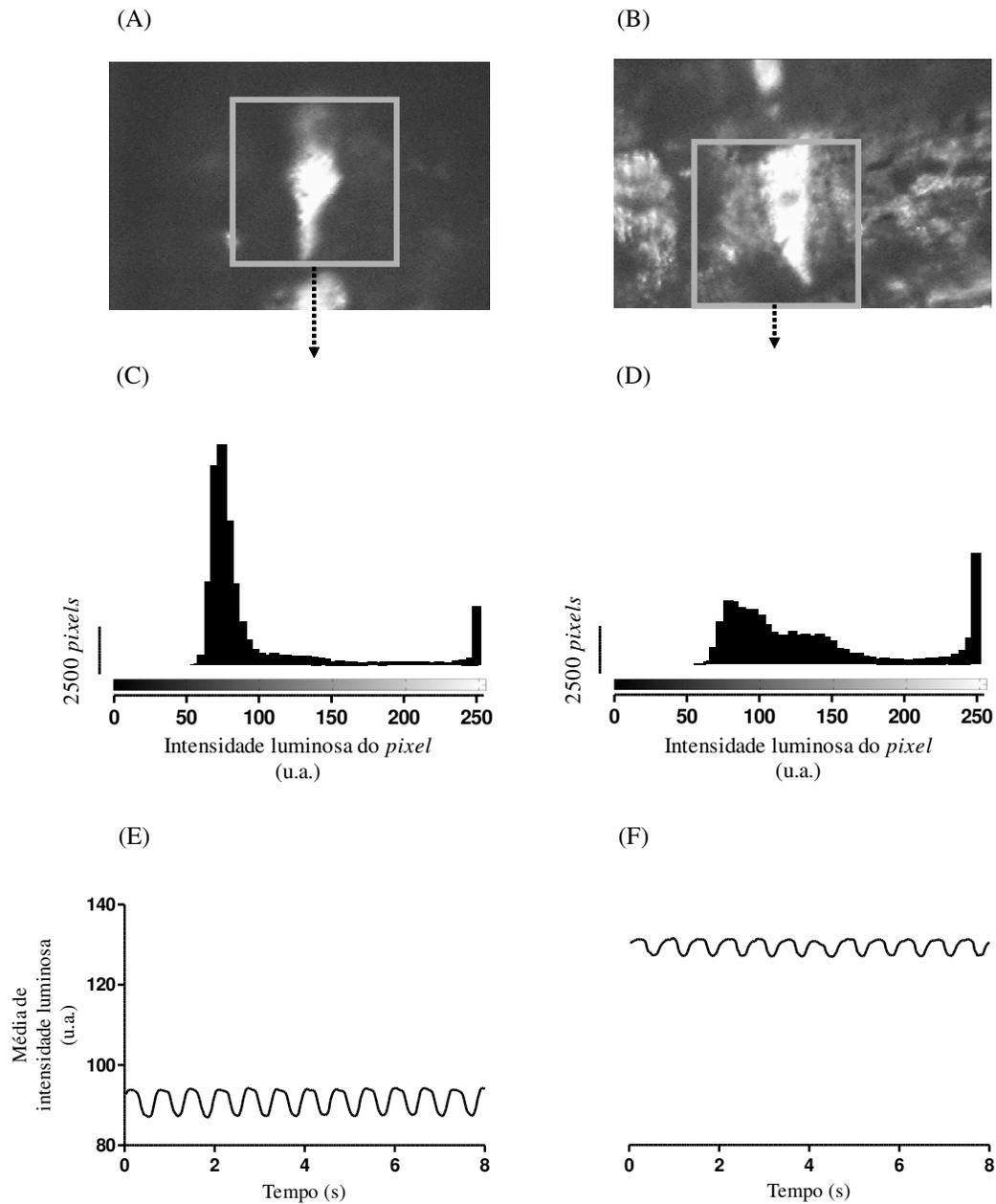


Figura 15 – Simulação do fotosensor. Em (A) e (B) são ilustrados quadros de duas preparações biológicas e nestes quadros está inserida a região quadrada simulada do fotosensor (área cinza). Em (C) e (D) os histogramas referentes à área que corresponde aos fotosensores de (A) e (B), respectivamente. Em (E) e (F) são apresentados registros da média da intensidade luminosa, ao longo do tempo, referentes às preparações biológicas de (A) e (B), respectivamente.

4.3-Alteração da frequência espontânea para diferentes $[Ca^{2+}]_o$

A Tabela 1 e a Figura 16 exibem a mudança da frequência espontânea do vaso dorsal do *T. molitor* frente ao aumento de $[Ca^{2+}]_o$ em mM. Para 0,0 mM a frequência espontânea foi nula. Nota-se que no intervalo de 0,0-1,0 mM o crescimento da curva se torna mais acentuado, enquanto que entre 2,0 e 4,0 mM ocorre pouca variação e para o intervalo de 8,0-16,0 mM a frequência espontânea não aumenta (saturação).

Tabela 1 - Frequência espontânea (média \pm erro padrão da média, bpm) do vaso dorsal em distintas $[Ca^{2+}]_o$.

$[Ca^{2+}]_o$ (mM)	1	2	4	8	16
Bpm	58,20 \pm 10,88	70,80 \pm 7,97	78,50 \pm 5,51	92,83 \pm 6,81	94,67 \pm 7,13
n	5	5	6	6	6

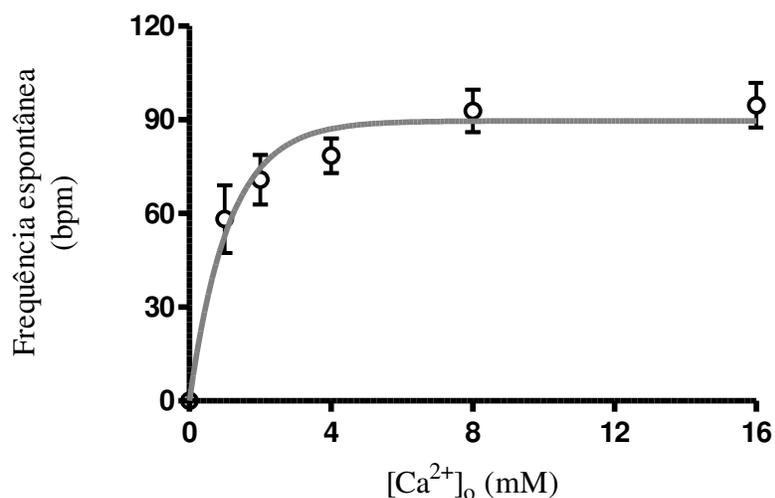


Figura 16 – Relação entre $[Ca^{2+}]_o$ e a frequência espontânea do vaso dorsal. A linha contínua ao ajuste, por regressão não-linear, dos pontos experimentais com uma função exponencial crescente ($R^2 = 0,98$ e $k = 0,89$).

Os resultados mostram que o vaso dorsal apresentou uma resposta cronotrópica positiva para aumentos da $[Ca^{2+}]_o$. Para estudo da amplitude de contrações em diferentes $[Ca^{2+}]_o$, sua frequência deve ser controlada (Kosh-Weser & Blinks, 1963). A seguir são

apresentados os resultados da resposta do vaso dorsal submetidos a estímulos elétricos exibidos em frequência fixa com diferentes durações e intensidades.

4.4-Curva intensidade-duração

A curva intensidade-duração foi ajustada pela equação de Weiss-Lapicque. Obteve-se um valor de reobase de $6,33 \pm 0,58$ V e cronaxia (tempo para intensidade igual ao dobro do valor reobase) $0,55 \pm 0,07$ ms. A Tabela 2 e a Figura 17 mostram os resultados para curva intensidade-duração.

Tabela 2 – Tensão limiar (média \pm erro padrão, V) necessária para estimular o vaso dorsal em uma dada duração (ms). A frequência estimulatória foi de 1,5 Hz e $[Ca^{2+}]_o$ de 4,0 mM.

Duração (ms)	Tensão Limiar (V)	n
0,1	$39,00 \pm 1,52$	3
0,2	$26,33 \pm 4,63$	3
0,4	$18,25 \pm 1,79$	4
0,8	$11,35 \pm 2,04$	4
1,0	$10,70 \pm 1,65$	5
2,0	$9,10 \pm 1,37$	5
4,0	$7,46 \pm 1,16$	5
8,0	$6,00 \pm 0,95$	5
16,0	$5,45 \pm 0,68$	4

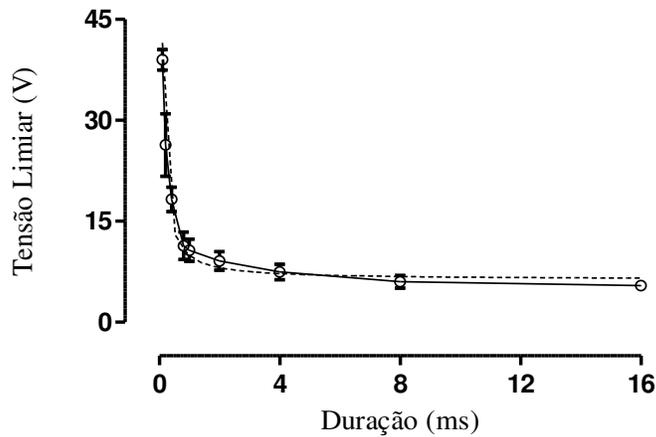


Figura 17 – Curva intensidade-duração no coração do inseto *T. molitor*. A linha pontilhada indica a curva aproximada por regressão não-linear da equação Weiss-Lapicque. E_{rh} encontrado foi de $6,34 \pm 0,58$ V, $c = 0,55 \pm 0,07$ ms e $R^2 = 0,88$. A linha contínua é a ligação dos pontos.

A Figura 18 ilustra a atividade contrátil do vaso dorsal antes e após a aplicação de estímulos na frequência de 1,5 Hz, com duração próxima à cronaxia e sob influência de $[Ca^{2+}]_o$ de 1,0 mM. Quando a atividade cronotrópica foi controlada pela estimulação elétrica (preparação respondia a uma frequência fixa), ocorreu imediata caracterização de um efeito inotrópico negativo da frequência estimulatória.

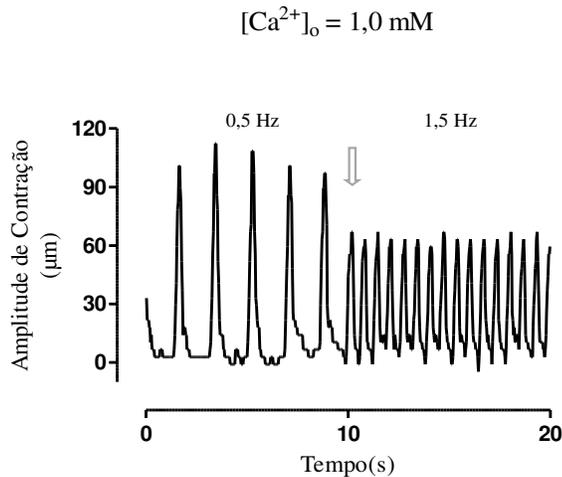


Figura 18 - Amplitude de contrações do vaso dorsal do *T. molitor* na presença de $[Ca^{2+}]_o$ 1,0 mM. Atividade miogênica espontânea (10 primeiros segundos, aproximadamente 0,5 Hz) e na presença da frequência controlada por estimulação elétrica (início apontado pela seta) a 1,5 Hz.

4.5-Relação entre a atividade inotrópica e cronotrópica

O vaso dorsal foi estimulado na faixa de frequências de 1,0 a 2,5 Hz, em $[Ca^{2+}]_o$ de 1,0 mM para que a frequência espontânea não ultrapassasse 1,0 Hz. A redução do diâmetro luminal e a porcentagem desta redução em relação ao diâmetro diastólico, para as diferentes frequências, são apresentadas na Tabela 3. A Figura 19 A ilustra a redução do diâmetro luminal do vaso dorsal para 4 frequências estimulatórias e a Figura 19 B apresenta a porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico nesta faixa de frequências.

A relação entre amplitude de contrações e a frequência foi negativa. A análise de variância monofatorial revelou redução significativa desta redução à medida que a frequência aumentou de 1,0 para 2,5 Hz ($p < 0,05$). Os resultados do teste de contraste estão mostrados na Tabela 3 e Figura 19.

Tabela 3 – Amplitude de contrações (média \pm EPM, μ m) e da porcentagem da redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal submetido a diferentes frequências.

Frequência(Hz)	Amplitude de Contrações (μ m)		Porcentagem de redução	
	Média \pm EPM	n	Média \pm EPM	n
1,0	73,56 \pm 7,01	6	57,41 \pm 4,25	6
1,5	76,00 \pm 10,02	6	58,41 \pm 9,33	6
2,0	51,65 \pm 6,08	6	40,15 \pm 7,79 ^{*,#}	6
2,5	43,61 \pm 10,49	5	28,41 \pm 4,26 ^{*,#}	5

Teste de Bonferroni: ^{*} $p < 0,05$ vs 1,0 Hz e [#] $p < 0,05$ vs 1,5 Hz

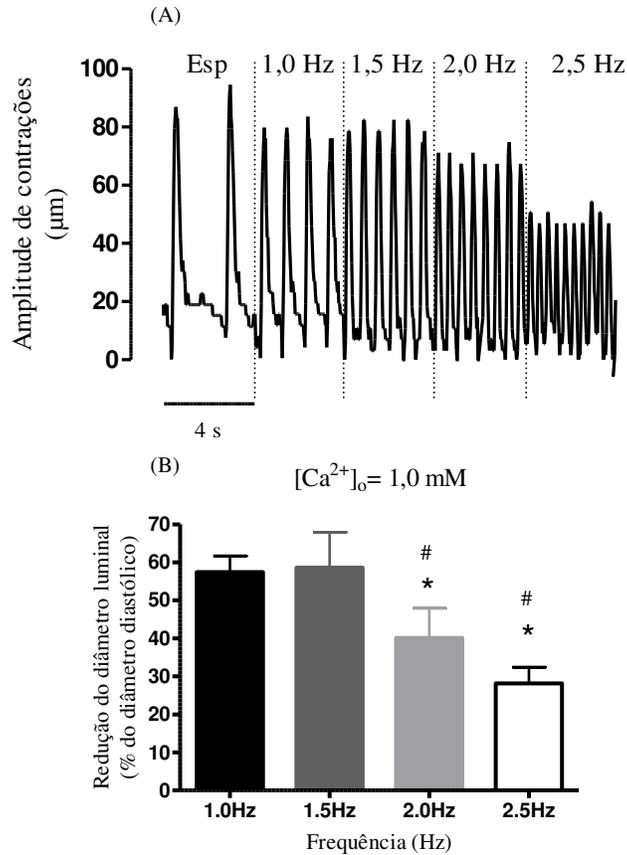


Figura 19 – (A) Amplitude de contrações (μm) do vaso dorsal em sua frequência espontânea (esp, $\sim 0,5$ Hz) e submetidos à frequências superiores (1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 Hz). (B) Porcentagem de amplitude de contrações em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal, submetido a $[Ca^{2+}]_o$ de 1,0 mM, em diferentes frequências. Os dados apresentaram distribuição normal, e foram submetidos à análise de variância monofatorial ($n = 6$). O asterisco e a cerquilha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.6-Atividade inotrópica positiva do aumento de $[Ca^{2+}]_o$

Sob estimulação elétrica, a frequência do vaso dorsal foi mantida em 1,5 Hz de modo a estimar a amplitude de contrações do vaso dorsal na presença de diferentes $[Ca^{2+}]_o$. A Tabela 4 mostra a amplitude de contrações e a porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico significativamente alterada pela $[Ca^{2+}]_o$. A Figura 20 A mostra a amplitude de contrações (traçado original), controlada em 1,5 Hz, quando $[Ca^{2+}]_o$ foi de 0,5; 2,0 ou 8,0 mM e a Figura 20 B mostra porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diastólico do vaso dorsal submetido às três $[Ca^{2+}]_o$.

Os resultados demonstram efeito inotrópico positivo do aumento da $[Ca^{2+}]_o$ no coração isolado do inseto *T. molitor*, ou seja, ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) da amplitude das contrações do vaso dorsal com o aumento de $[Ca^{2+}]_o$.

Tabela 4 - Amplitude de contrações (μm , média \pm EPM) e porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal quando submetido a diferentes $[Ca^{2+}]_o$.

$[Ca^{2+}]_o$ (mM)	Amplitude de Contrações (μm)		Porcentagem de redução	
	Média \pm EPM	n	Média \pm EPM	n
0,5	61,00 \pm 4,21	7	43,23 \pm 2,51	7
2,0	72,05 \pm 11,60	7	56,52 \pm 6,15	7
8,0	87,62 \pm 6,89 #	7	66,60 \pm 3,31 #	7

Teste de Bonferroni: # $p < 0,05$ vs 0,5 mM.

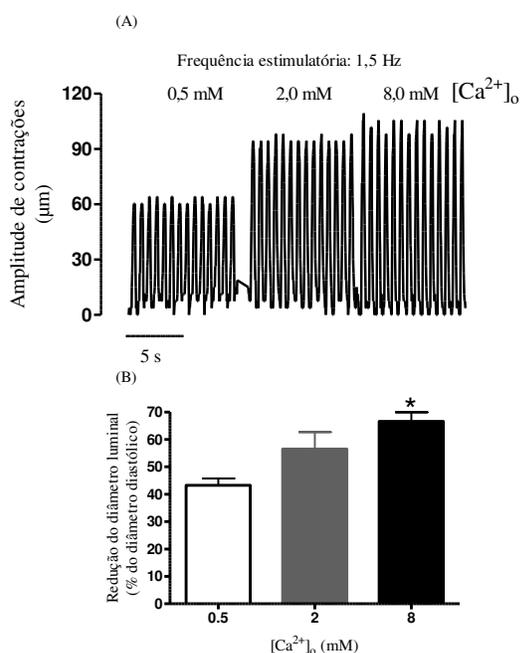


Figura 20 - (A) Resposta inotrópica positiva do vaso dorsal para diferentes $[Ca^{2+}]_o$. (B) Os dados foram submetidos à análise de variância monofatorial. O teste de comparação múltipla de Bonferroni revelou diferença significativa entre as porcentagens de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico em $[Ca^{2+}]_o$ de 0,5 e 8,0 mM ($p < 0,05$).

4.7- Resposta inotrópica negativa à cafeína

A Figura 21 ilustra a frequência e amplitude de contrações do vaso dorsal ao longo de todo protocolo experimental aplicado para estudar o efeito de Caff-10 em sua atividade contrátil.

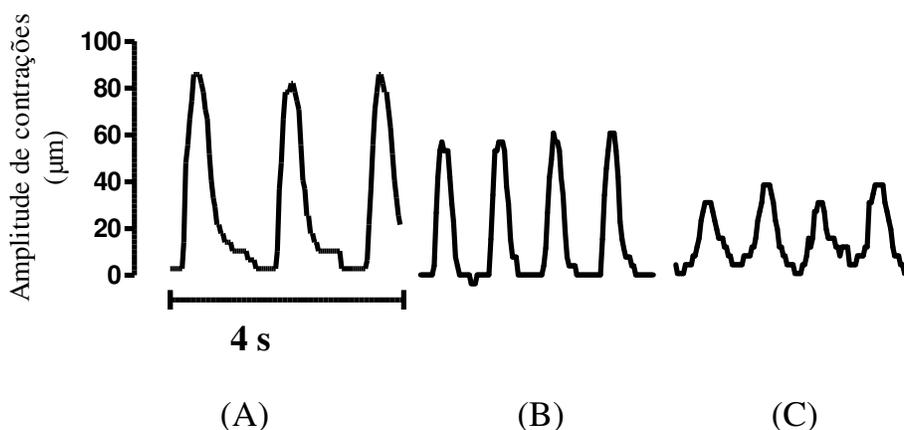


Figura 21 – Amplitude de contrações do vaso dorsal ao longo de todo protocolo experimental para estudo do efeito inotrópico da cafeína. (A)- amplitude de contrações espontâneas, (B)- sob estimulação de 1,0 Hz e (C)- ilustra, sob estimulação de 1,0 Hz, a amplitude sob influência de Caff-10.

Na presença de $[Ca^{2+}]_o$ de 4,0 Mm e Caff-10 a frequência espontânea do vaso dorsal foi de $0,50 \pm 0,06$ Hz ($n=7$). As amplitudes de contrações, quando o vaso dorsal foi estimulado a 1,0 Hz, na presença e na ausência de Caff-10, foram significativamente diferentes ($p<0,05$, Tabela 5). A Figura 22 A ilustra a amplitude de contrações na presença e na ausência de Caff-10 e a Figura 22 B apresenta a porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico, sob estimulação de 1,0 Hz, com e sem cafeína no meio de perfusão.

Tabela 5 - Amplitude de contrações (μm , média \pm erro padrão), diâmetro diastólico (μm , média \pm erro padrão), porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro diastólico do vaso dorsal e $t_{0,5}$ de relaxamento (s, média \pm erro padrão) quando submetidos à frequências estimulatórias de 1,0 Hz sem (controle) e com a presença de Caff-10 (cafeína)

	Controle	Caff-10
	Média \pm EPM	Média \pm EPM
Amplitude de contrações	100,80 \pm 10,68	67,6 \pm 8,20 [#]
Diâmetro diastólico	178,00 \pm 11,38	193,60 \pm 15,80
% do redução	56,32 \pm 4,85	35,05 \pm 3,86 [#]
$T_{0,5}$ de relaxamento	0,12 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01 [#]
n	7	7

Teste t-student: [#]p<0,05 vs Controle

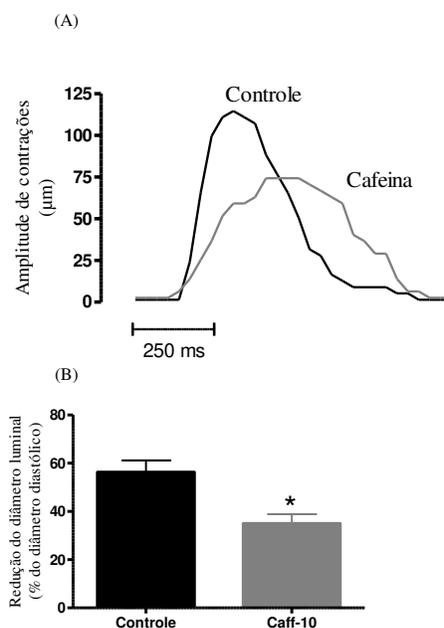


Figura 22 - (A) apresenta a resposta inotrópica negativa do vaso dorsal, quando estimulado em 1,0 Hz, frente a Caff-10. (B) ilustra a diferença significativa entre porcentagem de redução do diâmetro luminal em relação ao diâmetro luminal diastólico do vaso dorsal na condição controle e nos corações perfundidos com cafeína.

CAPÍTULO 5- DISCUSSÃO

5.1 – Instrumentação

O presente trabalho mostrou a possibilidade de se construir instrumentação para visualização do vaso dorsal *in situ*, no inseto *T. molitor* e estimar o encurtamento do órgão sob controle de frequência estimulatória para que se pudesse testar a sua atividade contrátil. A alternativa foi estimar o encurtamento a partir de imagens de vídeo obtidas com montagem experimental e tecnologia disponível no mercado e de baixo custo relativo. Não é do nosso conhecimento a existência de um sistema como este, disponível no mercado, para uso por pesquisadores interessados na fisiologia de insetos. O sistema desenvolvido pode ser utilizado para estudo de outras espécies, desde que o processo de isolamento e dissecação, bem como espessura do tecido cardíaco permitam transparência suficiente para a iluminação com luz branca. Estudos que envolvam a atividade espontânea do coração já foram desenvolvidos no nosso laboratório (Feliciano *et al.*, 2011). O presente aparato e preparação deixam clara a possibilidade de estudo de agentes inotrópicos e portanto constitui técnica complementar.

A instrumentação mostrou-se suficientemente robusta e de fácil utilização, tendo apresentado resultados satisfatórios, para duas estratégias (ou métodos) de medição diferentes. Uma bem simplificada que consistiu em avaliar a “quantidade de luz” pela contagem de *pixels* de um conjunto no centro do vaso dorsal (como um sensor de luz) e outra mais trabalhosa sob o ponto de vista de processamento que possibilita medir a distância entre as bordas das paredes paralelas da imagem do vaso dorsal. Os métodos mostraram-se aplicáveis, mas quantitativamente a detecção das bordas foi mais confiável. O método do sensor não parece ser uma boa alternativa quando se considera as diferenças que podem ocorrer entre preparações quanto a sua transparência.

Feita a calibração (*pixels vs.* encurtamento), os valores diastólicos, que indicam o maior diâmetro do vaso, encontrados ($148,70 \pm 5,09 \mu\text{m}$) ficaram mais próximos, mas ainda superiores, aos apresentados por Markou & Theophilidis (2000) que mostrou que a largura do vaso dorsal do *T. molitor* estaria em uma faixa de 80 a 130 μm , e superiores aos obtidos anteriormente em nosso laboratório (Feliciano *et al.*, 2011), que estimaram um diâmetro de $64,40 \pm 5,80 \mu\text{m}$ (animais escolhidos na faixa de 10 a 15 dias de idade). Esse valor acima dos encontrados da literatura pode ser devido ao uso de preparações

diferentes (tamanhos e idade dos animais) bem como diferenças no processo de dissecação (se os músculos alares são removidos o coração tende a um comprimento de repouso menor).

5.2 – Experimentação fisiológica

O vaso dorsal do inseto é miogênico (Mc Cann, 1963; Markou & Theophilidis, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Feliciano *et al.*, 2011). Desta forma, para estudar a atividade inotrópica é preciso controlar a frequência de contrações da preparação. A única forma de fazer isso é pela aplicação de estimulação supralimiar em frequência ligeiramente superior à frequência espontânea. Antes porém, é necessário que se conheça a excitabilidade da preparação. Os eletrodos de estimulação foram colocados de modo a estimular as células ao longo do seu eixo maior, considerando que as células estariam dispostas de modo helicoidal ao longo do vaso (Nation, 2008), otimizando a estimulação (Gomes *et al.*, 2001; Bassani *et al.*, 2006).

Uma vez estimulada, caracterizamos a excitabilidade da preparação pela curva intensidade-duração. Para cada duração, foi medida a tensão elétrica limiar de estimulação, e pela equação de Weiss-Lapicque foi estimada a cronaxia. O valor calculado ($0,55 \pm 0,07$ ms) ficou muito próximo do encontrado no coração de alguns mamíferos, quando estimulados com pulsos monopolares, como o miocárdio de porco (0,15 a 0,23 ms, Thomas Lawo *et al.*, 2009) e o epicárdio do coração humano (0,60 a 1,10 ms, Davies & Sowton, 1966). Em outras espécies a cronaxia tem sido encontrada maior (e.g. ratos adultos, $3,20 \pm 0,20$ ms, Gomes *et al.*, 2002). A causa destas diferenças ainda não está esclarecida, mas pode estar ligada, além de outros fatores, à diferenças nos protocolos experimentais.

Outro problema enfrentado para se estudar a atividade contrátil foi o fato do agente inotrópico utilizado ($[Ca^{2+}]_o$) apresentar também atividade cronotrópica. Se a frequência espontânea aumenta com o aumento da $[Ca^{2+}]_o$ fica difícil o controle de frequência. Isto limita o estudo, mas com base no efeito da $[Ca^{2+}]_o$ sobre a atividade cronotrópica (Feliciano *et al.*, 2011) e nos experimentos efetuados neste trabalho, foi possível estabelecer uma condição de adequada de estimulação. Sob $[Ca^{2+}]_o$ de 4,0 mM a frequência espontânea do vaso dorsal foi de $78,50 \pm 5,51$ bpm, o que nos sugeriu estimular o tecido com uma frequência ligeiramente acima (1,5 Hz ou 90 bpm) nesta

$[Ca^{2+}]_o$. Deste modo, foi possível caracterizar a resposta contrátil do vaso dorsal do inseto ao aumento da $[Ca^{2+}]_o$ e mostrar um efeito inotrópico positivo.

A redução da $[Ca^{2+}]_o$ gera prolongamento do potencial de ação medido *in situ* no vaso dorsal do *T. molitor* (Markou & Theophilidis, 2000). Este fato parece estar ligado, segundo estes autores, à redução da concentração intracelular do íon e consequente redução da atividade de canais de potássio cálcio-dependentes, importantes no processo de repolarização. Assim, assume-se que Ca^{2+} entre na célula provavelmente através de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão. É possível que a entrada de Ca^{2+} ative a liberação de Ca^{2+} do RS pelo mecanismo de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (Fabiato, 1983). Os dois mecanismos tenderiam a aumentar a concentração intracelular do íon e consequentemente a atividade contrátil do tecido (aqui observada pelo encurtamento do vaso). A existência de RS já está confirmada em algumas espécies (Hagopian & Spiro, 1967; Mc Cann, 1970; Takekura & Armstrong, 2002; Nation, 2008) e funcionalmente no *T. molitor* controlando a atividade marcapasso (Feliciano *et al.*, 2011) e agora contração, tendo em vista os dados apresentados neste trabalho, que mostram que a cafeína, composto conhecido por ser capaz de depletar o Ca^{2+} do RS. A cafeína é lipofílica, pode facilmente atravessar a membrana celular. Uma vez dentro da célula se liga aos canais de liberação de Ca^{2+} do RS (também referidos por receptores de rianodina) e os sensibilizam ao Ca^{2+} . Isto significa que a concentração intracelular do íon (150 nM) torna-se suficiente (enquanto a cafeína é apresentada às células) para liberar o Ca^{2+} reticular. Na presença de cafeína, portanto, acaba ocorrendo um fluxo de Ca^{2+} resultante para fora do RS (Bers, 2002).

Com a metodologia que permite estimar a amplitude de contrações, a atividade cronotrópica foi controlada com aplicação de estímulos elétricos com durações próximas à cronaxia (a partir da determinação da curva intensidade-duração). Há muito tempo se sabe que a RFF difere entre as espécies (Koch-Weser & Blinks, 1963). Estudar a relação RFF é importante para o entendimento da fisiologia, uma vez que a frequência é um determinante direto (embora não único) do débito cardíaco (volume de sangue bombeado pelo coração por minuto).

Os mecanismos envolvidos na RFF são complexos. A maioria das espécies de mamíferos testadas apresenta RFF positiva em pelo menos parte do intervalo de frequências estudado. A grande exceção é o rato cuja RFF é em princípio negativa.

A explicação para a RFF positiva é mais uniforme na literatura. É possível que o aumento da frequência acabe por levar a um aumento da concentração intrareticular de Ca^{2+} , o que levaria a aumento da liberação do íon para a contração (Bassani *et al.*, 1995).

Pieske *et al.* (1999) e Maier *et al.* (2000) utilizaram a técnica de *Rapid Cooling Contracture* para investigar mudanças no conteúdo de Ca^{2+} do RS em músculo cardíaco isolado de coelhos e coração humano, respectivamente. O aumento da frequência estimulatória, de 0,5 a 3,0 Hz, em coelhos e no coração humano parece contribuir para aumento da atividade de SERCA aumentando a carga de Ca^{2+} do RS. Monasky *et al.* (2009) demonstraram, em coelhos, que mesmo após a inibição da captação de Ca^{2+} pelo bloqueio seletivo da ATPase de Ca^{2+} do RS com o alcaloide rianodina se preserva a RFF positiva com ligeira redução de força quando comparada com grupo não tratado com o bloqueador. Um fator que poderia influenciar esta preservação de RFF é o aumento do influxo de Ca^{2+} via canais de Ca^{2+} tipo L, de membrana ($I_{\text{Ca,L}}$) na ausência da função de RS, uma vez que coelhos possuem um PA mais longo (Bassani *et al.*, 2004). Em resumo, qualquer que seja o mecanismo (maior entrada de Ca^{2+} ou maior liberação durante a contração), o aumento de força pelo aumento de frequência estaria relacionado a um aumento da disponibilidade de Ca^{2+} para a contração.

No rato os mecanismos são mais complexos. O conteúdo de Ca^{2+} do RS é praticamente inalterado com aumento da frequência estimulatória de 0,5 até 3,0 Hz. Maier *et al.* (2000) propôs que pudesse ocorrer uma lenta recuperação dos RyRs do estado inativo para o estado ativável (Gyorke & Fill, 1993; Schieffer *et al.*, 1995) com o aumento da frequência estimulatória, implicando na diminuição da quantidade de Ca^{2+} disponível para contração, pois os canais de liberação não teriam se recuperado do estado refratário. Evidências eletrofisiológicas e medições do Ca^{2+} intracelular em células ventriculares isoladas de rato mostraram que a diminuição da frequência reduz $I_{\text{Ca,L}}$, o transiente de Ca^{2+} e a liberação fracional (FR) de Ca^{2+} do RS (Ricardo, 2010). Estes resultados sugeriram que a relação negativa entre FR e a frequência, nesta espécie, se deve principalmente a modificações de $I_{\text{Ca,L}}$, que é o principal *trigger* para liberação de Ca^{2+} do RS durante o acoplamento excitação-contração. Redução desta corrente de membrana é capaz de diminuir a fração do conteúdo de Ca^{2+} do RS liberada a cada contração (Bassani *et al.*, 1995).

Não foi objetivo do presente trabalho dissecar os mecanismos envolvidos na relação negativa entre amplitude de contrações e frequência (indicativa de uma possível

RFF negativa) encontrada no coração do inseto. Este tipo de trabalho poderá ser feito mais adiante quando se tornar possível isolar células viáveis para estudo. Contudo, uma abordagem preliminar foi feita pela aplicação de cafeína. O fármaco produziu o seu efeito inotrópico negativo típico e possibilitou confirmar o papel funcional do RS na atividade inotrópica. Será importante no futuro investigar se há redução do influxo celular de Ca^{2+} ou se neste caso o RS tem sua carga reduzida.

CAPÍTULO 6- CONCLUSÕES

O método desenvolvido no presente trabalho permitiu estimar a amplitude de contrações do vaso dorsal, tanto durante contrações espontâneas, quanto durante estimulação elétrica para controle da frequência estimulatória.

O vaso dorsal do *T. molitor* responde, sob o ponto de vista inotrópico, a agentes de efeito positivo ($[Ca^{2+}]_o$) ou negativo (cafeína) de modo a sugerir a existência de participação funcional do RS na resposta.

Tendo em vista os resultados obtidos, a preparação do coração isolado do inseto *T. molitor* parece ser uma ferramenta promissora para estudo e ensino de aspectos da atividade contrátil e da fisiologia do coração.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSANI, R.A.; ALTAMIRANO, J.; PUGLISI, J.L.; BERS, D.M. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, v. 559, p. 593-609, 2004.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *Journal of Physiology*, v. 476, p. 279-293, 1994.

BASSANI, J.W.M.; FELICIANO, D.F.; FIM NETO, A.; OLIVEIRA, P.X.; BASSANI, R.A. Teaching heart physiology to bioengineers using the insect heart. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica 2010, 21-25 nov, Tiradentes. *Anais do XXII Congresso de Engenharia Biomédica*.

BASSANI, J.W.M.; YUAN, W.; BERS, D.M. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*, v. 268, p. 1313-1319, 1995.

BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M.; BERS, D.M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *Journal of Physiology*, v. 453, p. 591-608, 1992.

BASSANI, R.A.; LIMA, K.A.; GOMES, P.A.P.; OLIVEIRA, P.X.; BASSANI, J.W.M. Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes. *Physiological Measurements*, v. 27, n. 9, p. 851-863, 2006.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STATON, B.A. Fisiologia. *Elsevier*, 2004, Rio de Janeiro 5. ed. 1082 p.

BERS, D. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. *Kluwer Academic Publishers*, 2001.

BISHOPRIC, N.H. Evolution of the heart from bacteria to man. *New York Academy of Science*, v. 1047, p. 13-29, 2005.

CHOMA, M.A.; SUTER, M.J.; VAKOC, B.J.; BOUMA, B.E.; TEARNEY, G.J. Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Disease Models and Mechanisms*, v. 4, p. 411-420, 2011.

DA SILVA, S.; DA SILVA, R.; LANGE, A.B. Effects of crustacean cardioactive peptide on the hearts of two Orthopteran insects, and demonstration of a Frank-Starling-like effect. *General and Comparative Endocrinology*, v. 171, p. 218-224, 2011.

DAVIES, J.G.; SOWTON, E. Electrical threshold of the human heart. *British Heart Journal*, v. 28, p. 231-239, 1966

ENDO, M. Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *European Journal of Pharmacology* v. 500, p. 73–86, 2004.

FABIATO, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology : Cell Physiology*, v. 245, p 1–14 1983.

FELICIANO, D; OLIVEIRA, P.X.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J.W.M. Pacemaker activity in the insect (*T. molitor*) heart: role of reticulum sarcoplasmatic. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* v. 301, p. 1838–1845, 2011.

GYÖRKE, S.; FILL, M. Ryanodine receptor adaptation : control mechanism of Ca^{2+} - induce Ca^{2+} release in heart. *Science* v. 260, p. 807–809, 1993.

GOMES, A.P.G.; GALVÃO, K.M.; MATEUS, E.M. Excitability of isolated hearts from rats during postnatal development. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 13, p. 355 – 360, 2002.

GOMES, P. A. P.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J.W.M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 48, n. 6, p. 630-635, 2001.

GULLAN, P.J.; CRANSTON, P.S. Os insetos: um resumo de entomologia. 3a ed., Roca, São Paulo, 2007, P 440.

HAGOPIGEAN,M; SPIRO.D. The sarcoplasmic reticulum and its association with the T-system in an insect. *Journal of Cellular Biology* v. 32, p. 535-545, 1976.

HERTEL, W.; PASS, G. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* v. 133, p. 555–575, 2002.

JENNINGS, T.; RINGO, J.; DOWSE, H. The Relationship of Heart Function to Temperature in *Drosophila melanogaster* and its Heritability. *Journal of Experimental Zoology*. v. 399, p. 689–696, 2009.

JOHNSON,E.; SHERRY, T.; RINGO,J.; DOWE, H. Modulation of the cardiac pacemaker of *Drosophila*: cellular mechanisms. *Journal Comparative Physiology B*. v.172, p. 227-236, 2002.

KATZ, A.M. *Physiology of the Heart*. 3 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 697 p.

KOCH-WESER, J.; BLINKS, J. The influence of the interval between beats on myocardial contractility. *Pharmacological Reviews* v. 15, p. 601–652, 1963.

LOPES, C.P.; VILLELA, G. Trealose e trealase em *Tenebrio molito* I. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v. 70, n. 4, p. 577-583, 1972.

MAIER, L.S.; BERS, D.M.; PIESKE, B. Differences in Ca^{2+} - handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -content in isolated rat and rabbit myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* v. 32, p. 2249–2258, 2000.

MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. *Bioelectromagnetism – Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York: Oxford University Press, 1995. 512 p

MALTSEV, V.A.; VINOGRADOVA,T.M.; LAKATTA,E.G. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *Journal of Pharmacological Science*, v. 100, p. 338–369, 2006.

MARCINIAK, P.; GRODECKI,S.; KONOPINSKA,D.; ROSINSKI,G. Structure-activity relationships for the cardiotropic action of the Led-NPF-I peptide in the beetles *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Journal of Peptide Science*. 2007

MARKOU, T., THEOPHILIDIS, G. The pacemaker activity generating the intrinsic myogenic contraction of the dorsal vessel of *T. molitor* (Coleoptera). *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 3471-3483, 2000.

MATÍAS, G; SOSA, M.E; DONADEL, O.J; GIORDANO, O.S; TONN, C.E. Effect of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). v. 62, p. 17-26, 2003.

MC CANN, F.V. Electrophysiology of an insect heart. *The Journal of General Physiology* v. 46, p. 803–821, 1963.

MC CANN, F.V. Physiology of insect heart. *Annuals Review of Entomology*, v. 15, p. 173-198, 1970.

MONASKI, M.M.; JANSEN, P.M.L. The positive force-frequency relationship is maintained in absence of sarcoplasmic reticulum function in rabbit, but not in rat myocardium. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 179, p. 469-479, 2009.

NATION, J.L. *Insect physiology and Biochemistry*, New York, CRC Press, 2008.

NICHOLS, R. FMRFamide-related peptides and serotonin regulate *Drosophila melanogaster* heart rate: Mechanisms and structure requirements. *Peptides*, v. 27, p. 1130–1137, 2006.

NISHIMURA, M.; OCORR, K.; BODMER, R.; CARTRY, J. *Drosophila* as a model to study cardiac aging. *Experimental Gerontology*, 2011.

OCORR, K.; REEVES, N.L.; WESSELS, R.J.; FINK, M.; VICENT CHEN, H.-S.; AKASAKA, T.; YASUDA, S.; METZGER, J.M.; GILES, W.; POSAKONY, J.W.; BODMER, R. KCNQ potassium channel mutations cause arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 104, n. 10, p. 3943-3848, 2007.

PAPAEFTHIMIOU, C., THEOPHILIDIS, G. Octopamine-A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs. inhibition. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, p. 316-325, 2011.

PIESKE, B.; BERS, D.M.; MAIER, L.S.; HASENFUSS, G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circulation Research* v. 85, p. 38–46, 1999.

RICARDO, R.A. Liberação fracional de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático em miócitos cardíacos de ratos estimulados em diferentes frequências 2010, 80 p.. Dissertação de Doutorado em Engenharia Elétrica. Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas.

RUKNUDIN, A.; VALDIVIA, C.; KOFUJI, P.; LEDERER, W.J.; SCHULZE, H. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in *Drosophila*: cloning, expression, and transport differences. *American Journal of Physiology*, v. 15, p. 257-265, 1997.

SANTOS, A. K; FARONI, L.R.A; GUEDES, R.N.C; SANTOS, J.P.S; ROZADO, A.F. Nível de dano econômico de *Sitophilus zeamais* (M.) em trigo armazenado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 6, n. 2, p. 273-279, 2002.

SCHIEFER, A.; MEISSNER, G.; ISENBERG, G. Ca²⁺ activation and Ca²⁺ inactivation of canine reconstituted cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channels. *Journal of Physiology*, v. 489, n. 2, p. 337–348, 1995.

SILVERTHORN, D.U. Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada. 3. ed. Barueri: Manole, 2008.

SLAMA, K. A new look at the comparative physiology of insect and human hearts. *Journal of Insect Physiology* v. 58, n. 8, p. 1072 – 1081, 2012.

SZYMANOWSKA, K.; KONOPINSKA, D.; ROSINSKI, G; MARCINIAK, P.; Synthesis, cardiostimulatory, and cardioinhibitory effects of selected insect peptides on *Tenebrio molitor*. *Journal of Peptide Science*, v. 14, p. 708–713, 2008.

TAKEKURA, H.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. The structure of Ca²⁺ release units in Arthropod body muscle indicates an indirect mechanism for excitation-contraction coupling. *Biophysical Journal*, v. 83, p. 2742-2753, 2002.

TARTES, U., VANATOA, A., KUUSIK, A. The insect abdomen-a heartbeat manager in insects? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.133, p. 611–623, 2002.

THOMAS, L; THOMAS DENEKE, M.D.; SCHRADER, J.; DANILOVIC, D.; WENZEL, B.; BUDDENSIEK, M.; MUEGGE, A. A Comparison of Chronaxies for Ventricular Fibrillation Induction, Defibrillation, and Cardiac Stimulation: Unexpected Findings and Their Implications. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 20, n.3, p. 307-314, 2009.

VARGAS, C.H.B; ALMEIDA, A.A. Influência da temperatura no desenvolvimento de *Gnathocerus cornutus* (Coleoptera, Tenebrionidae). I. Fases imaturas. *Acta Biológica Paranaense*, v. 21, p. 149-159, 1992

WANTO, M. M.; FISCHER, M.L. Comportamento sexual de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1785 (Insecta, Coleoptera). *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 7,n. 1, p. 143-164, 2005.

WASIELEWSKI, O.; SKONIECZNA, M. Pleiotropic effects of the neuropeptides CCAP and myosuppressin in the beetle, *Tenebrio molitor* L. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 178, p. 877-885, 2008.

YINON, U. The visual mechanisms of *Tenebrio molitor*: some aspects of the spectral response. *Journal of Experimental Biology*, v. 53, p. 221-229, 1970.

ZACHARIASSEN, K.E. Physiology of cold tolerance in insects *Physiological Reviews*, v. 65, n. 4, p 799-832, 1985.

WOLF, M.J. Modeling Dilated Cardiomyopathies in *Drosophila*. *Trends Cardiovascular Medicine* v. 22, n. 3, p. 55–61, 2012.