



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
BIOMÉDICA

**Mecanismos Envolvidos na Depressão Contrátil e Lesão
de Miócitos Cardíacos Submetidos a Campos Elétricos de
Alta Intensidade**

Autor: Pedro Xavier de Oliveira

Orientador: Prof. José Wilson Magalhães Bassani

Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Trabalho apresentado à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da UNICAMP como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Prof. Dr. Airton Ramos
Prof. Dr. Paulo Alberto Paes Gomes
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior
Prof. Dr. José Antenor Pomílio
Profa. Dra. Vera Lúcia da S. N. Button
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa

Campinas, abril de 2008
SP – Brasil

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

OL4m Oliveira, Pedro Xavier de
Mecanismos envolvidos na depressão contrátil e lesão de
miócitos cardíacos submetidos a campos elétricos de alta
intensidade / Pedro Xavier de Oliveira. --Campinas, SP:
[s.n.], 2008.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana
Almada Bassani.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Campos elétricos. 2. Coração - Ventrículos. 3.
Estímulos elétricos. 4. Desfibriladores. I. Bassani, José
Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Mechanics involved in the depression contractile and
injury of cardiac myocytes submitted to the high intensity
electric fields.

Palavras-chave em Inglês: Defibrillation, Electric field, Heart,
Electroporation.

Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Ailton Ramos, Paulo Alberto Paes Gomes, Wilson
Nadruz Júnior, José Antenor Pomílio, Vera Lúcia da
Silveira Nantes Button e Eduardo Tavares Costa.

Data da defesa: 16/04/2008

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

Candidato: Pedro Xavier de Oliveira

Data da Defesa: 16 de abril de 2008

Título da Tese: "Mecanismos Envolvidos na Depressão Contrátil e Lesão de Miócitos Cardíacos Submetidos a Campos Elétricos de Alta Intensidade"

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

Prof. Dr. Airton Ramos: _____

Dr. Paulo Alberto Paes Gomes: _____

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior: _____

Prof. Dr. José Antenor Pomílio: _____

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa: _____

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button: _____

Resumo

A desfibrilação é a única terapia conhecida para reverter o quadro de fibrilação ventricular. Entretanto, a estimulação do coração com campos elétricos de grande magnitude durante a desfibrilação pode lesar miócitos cardíacos, e, como consequência, a eficiência contrátil do coração ser reduzida. Neste trabalho, estudamos o efeito da estimulação por campo elétrico (**E**) de alta intensidade sobre miócitos cardíacos isolados de rato. O valor máximo de potencial extracelular gerado por **E** (V_{e-max}) foi estimado usando-se um modelo eletromagnético. Os principais resultados foram: a) A aplicação de **E** de alta intensidade causa aumento sustentado de $[Ca^{2+}]_i$ citoplasmática ($[Ca^{2+}]_i$), bem como contratatura, que são dependentes de $[Ca^{2+}]_e$ extracelular; para campos maiores que 50 V/cm, estas respostas são irreversíveis e levam à morte celular; b) retículo sarcoplásmico, mitocôndrias, trocador Na^+-Ca^{2+} e canais de Ca^{2+} do sarcolema não contribuem de forma significativa para estes efeitos; c) durante aplicação de choques a células despolarizadas com alta $[K^+]_e$ extracelular, observou-se um incremento de V_{e-max} semelhante ao valor do potencial transmembrana de repouso ($V_m \sim -85$ mV), o que indica que V_{e-max} pode ser considerado uma estimativa razoável da máxima variação de V_m durante o choque; d) aumento da resistência celular ao efeito letal de **E**, avaliada pelo valor de **E** associado a probabilidade de letalidade de 50% (EL50), ocorreu com a aplicação de pulsos bipolares da mesma energia, durante a estimulação de receptores β -adrenérgicos, e em miócitos isolados de animais nos quais foi induzido *stress* por imobilização e choques nas patas repetidos. Conclui-se que: a) O aumento sustentado de $[Ca^{2+}]_i$ ocorre provavelmente por influxo do íon através de poros hidrofílicos formados na membrana devido à imposição de **E** de alta intensidade (eletroporação); b) a superioridade de pulsos desfibrilatórios bipolares, já descrita na literatura, pode dever-se, pelo menos em parte, pelo menor potencial letal desta forma de onda; c) tanto a estimulação β -adrenérgica *in vitro*, quanto a condição de *stress* parecem conferir proteção contra o efeito letal de **E**. Espera-se que estes resultados representem uma contribuição para o desenvolvimento de procedimentos mais seguros, tanto para desfibrilação, quanto para estimulação marca-passo do coração.

Abstract

Electric defibrillation is currently the treatment able to reverse ventricular fibrillation. However, cardiac stimulation with high-intensity electric fields may cause injury to myocardial cells, thus impairing cardiac contractility. In this study, the effects of high-intensity electric fields (**E**) on isolated rat ventricular myocytes were analyzed. The maximum value of field-induced extracellular potential (V_{e-max}) was estimated using an electromagnetic model. Our main results were: a) Application of high-intensity **E** causes sustained increase in cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ and marked cell contracture, and both effects depend on the presence of extracellular Ca^{2+} ; for $E > 50$ V/cm, these responses are irreversible and lethal injury develops; b) sarcoplasmic reticulum, mitochondria, Na^+ - Ca^{2+} exchanger and sarcolemmal L-type Ca^{2+} channels do not seem to contribute significantly to such effects; c) when shocks were applied to cells depolarized by high extracellular $[K^+]$, V_{e-max} was increased by an extent that was close to the value of the resting transmembrane potential ($V_m \sim -85$ mV), which indicates that V_{e-max} may be considered a reasonable estimation of the maximum variation of V_m during the shock; d) increase in cell resistance to the lethal effect of **E**, assessed as the value of **E** associated to 50% probability of lethality (EL50), was observed during application of biphasic stimuli with the same pulse energy, during β -adrenergic receptor stimulation, and in myocytes isolated from rats in which stress was induced by repeated immobilization and footshock. It may be concluded that: a) The sustained increase in $[Ca^{2+}]_i$ is probably due to Ca^{2+} influx through hydrophilic membrane pores generated during application of high-intensity **E** (electroporation); b) the better defibrillation results described in the literature with biphasic shock may be due, at least partly, to the lesser ability of this waveform to cause lethal injury; c) both *in vitro* β -adrenergic stimulation and the stress condition *in vivo* appear to exert a protective effect against the lethal effect of **E**. We expect that the present results may contribute to the development of safer procedures for both pacemaker and defibrillatory field stimulation of the myocardium.

Apoio

Este trabalho teve o apoio imprescindível da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, Proc.: 04/10652-6, bolsa de doutorado).

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram na execução deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica e pesquisadores do Centro de Engenharia Biomédica, em especial aos professores José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani pela orientação, apoio e competência, imprescindíveis ao desenvolvimento da tese.

Aos secretários, engenheiros, técnicos e estagiários do Centro de Engenharia Biomédica, em especial às secretárias Nirlei Vitareli Souza e Adriana C. Andrade, ao engenheiro Sérgio Paulo Moura, aos técnicos Eugênio Carrara, Mauro Sergio Martinazo, e Márcia de Almeida Queiroz, e à bióloga Elizângela S. Oliveira, pelo apoio técnico completo e eficiente.

Aos alunos e ex-alunos do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial a Rafael de Almeida Ricardo, pelo apoio, paciência e amizade.

Dedico este trabalho
à minha mãe, Antônia.

Sumário

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	01
Capítulo 2 – OBJETIVOS	08
Capítulo 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	09
3.1 – ANIMAIS	09
3.2 – SOLUÇÕES	09
3.3 – MIÓCITOS VENTRICULARES	11
3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS	11
3.5 – MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+}	15
3.6 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	17
3.7 – DETERMINAÇÃO DA POLARIZAÇÃO INDUZIDA PELO CAMPO ELÉTRICO	20
3.8 – PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	22
Capítulo 4 – RESULTADOS	23
4.1 – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DEPRESSÃO CONTRÁTIL E MORTE CELULAR	23
4.2 – DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO E LETALIDADE	31
Capítulo 5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	43
5.1 – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DEPRESSÃO CONTRÁTIL E MORTE CELULAR	43
5.2 – DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO E LETALIDADE	47
5.3 – RESUMO E CONCLUSÕES	56
Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE - A	67
A.1 – PROGRAMAS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO	67
A.2 – DETECTOR DE BORDA DE SINAL DE VÍDEO MICROCONTROLADO	76

Lista de Abreviaturas

- 2a – Dimensão do eixo menor da célula
- 2c - Dimensão do eixo maior da célula
- AEC - Acoplamento excitação contração
- [Ca]_i - Concentração intracelular de Ca²⁺
- [Ca]_o - Concentração extracelular de Ca²⁺
- CCD - *Charge coupled device*
- DBV - Detector de borda de sinal de vídeo
- V_{e-max}50 - valor médio de V_{e-max} correspondente a 50% de letalidade
- ΔV_m - Variação do potencial transmembrana
- ΔV_{max} - Variação máxima do potencial transmembrana
- ΔV_T - Variação máxima do potencial transmembrana no limiar de estimulação
- E** - Campo elétrico aplicado
- EAP - Estimulador de alta potência
- EBP - Estimulador de baixa potência
- EL50 - Campo elétrico correspondente a 50% de letalidade média
- E_T - Campo elétrico limiar de estimulação
- FCCP - Soluções de carbonil-cianeto p-(tri-fluorometoxi)-fenil-hidrazona
- GLUT - Solução cardioplégica
- IC95% - Intervalo de confiança para 95%
- ISO - Isoproterenol
- LED - *Light emitting diode*
- MF – Miofilamentos
- n - Coeficiente de Hill da curva sigmóide
- NCX - Trocador Na⁺/Ca²⁺
- NT - Solução de Tyrode
- OSC - Osciloscópio digital
- PA - Potencial de ação
- RS - Retículo sarcoplasmático
- SAD - Sistema de aquisição de dados
- TG - Thapsigargin
- Tyr-00 - Solução NT sem cálcio e sódio

Tyr-0Ca - Solução NT sem cálcio

Tyr-K - Solução despolarizante

VCR - Aparelho gravador de vídeo cassete

V_e - Potencial elétrico extracelular

V_{e-max} - V_e máximo

V_m - Potencial transmembrana

Trabalhos afins publicados pelo autor

Resumos em congresso:

- Oliveira P.X., Bassani R.A., Bassani J.W.M. Influência da forma de onda estimulatória no efeito letal do campo elétrico sobre miócitos cardíacos isolados. *XXII Reunião Anual da Sociedade de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, SP. Agosto de 2007 (Anais Fesbe 2007).
- Oliveira P.X., Bassani R.A., Bassani J.W.M. Estimativa do potencial transmembrana letal em miócitos ventriculares de rato. *XXI Reunião Anual da Sociedade de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, SP. Agosto de 2006 (Anais Fesbe 2006).
- Oliveira P.X., Bassani R.A., Bassani J.W.M. Cytosolic Ca^{2+} accumulation in ventricular myocytes after stimulation with high-intensity electric fields (HEF). *49th Annual Meeting of the Biophysical Society*. Long Beach, CA, USA. Fevereiro de 2005 (*Biophys J* 88, suppl.1, abstr N. 1514-Pos).

Artigos em congresso:

- D. C. Soriano, R. A. Ricardo, P. X. Oliveira, R. A. Bassani & J. W. M. Bassani. Instrumentação para medição de transientes de Ca^{2+} em miócitos cardíacos isolados: efeitos da estimulação beta-adrenérgica. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, São Pedro, SP, Outubro de 2006.
- R. A. Ricardo, P. X. de Oliveira, D. C. Soriano & J. W. M. Bassani. Geração e medição de potencial transmembrana: modelo experimental simplificado para uso didático. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, São Pedro, SP, Outubro de 2006.
- R. A. Ricardo, P. X. de Oliveira, R.A. Bassani & J. W. M. Bassani. Dispositivo óptico de imagens celulares: relação encurtamento-intervalo em cardiomiócitos. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, São Pedro, SP, Outubro de 2006.

Artigo em revista nacional:

-Ricardo, R. A.; Oliveira, P. X.; Bassani, R. A.; Bassani, J. W. M. Compact cell image projector: application to study the relationship between stimulus interval and contraction amplitude in isolated cardiomyocytes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 22: 151-160, 2007.

Artigo em revista internacional:

- 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. *Physiol. Meas.*, 27: 851-863, 2006.
- Oliveira P.X., Bassani R.A., Bassani J.W.M. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. *IEEE Trans. Biomed. Engin.*, 2008 (*in press*).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O coração é um órgão vital cuja função é bombear o sangue para as circulações pulmonar e sistêmica. A eficiência do bombeamento cardíaco requer atividade rítmica e coordenada de átrios e ventrículos (câmaras cardíacas), segundo um padrão seqüencial de excitação e contração. A atividade contrátil das células do coração é iniciada por uma onda de ativação elétrica, o potencial de ação (PA), que consiste de uma variação rápida do potencial transmembrana (V_m) a partir do valor de repouso (cerca de -85 mV). Durante o PA, ocorre despolarização da membrana e rápida reversão de V_m (que pode atingir um valor máximo de 20 a 40 mV), seguidas de retorno ao potencial de repouso.

O PA é disparado quando a impedância da membrana cai devido à abertura de um grande número de canais de Na^+ dependentes de tensão elétrica, que ocorre quando V_m atinge um valor crítico, o potencial limiar, menos negativo que o potencial de repouso. No coração, a variação de V_m na direção do potencial limiar ocorre devido à estimulação elétrica, fisiológica ou não, da célula. Uma vez disparado, o PA se propaga por toda a célula, por meio do acoplamento espacial da corrente elétrica (teoria dos circuitos locais, Aidley, 1989). Embora as células cardíacas sejam independentemente excitáveis, elas são interligadas intimamente por estruturas juncionais complexas (discos intercalados), onde se encontram conexões de baixa resistência (*gap junctions*). Assim, a íntima ligação elétrica entre células cardíacas permite que a ativação elétrica de uma célula se propague para outra por meio do acoplamento espacial de corrente através dessas junções (Garcia, 1997).

O conjunto de eventos desde a ativação elétrica das células cardíacas até o desencadeamento da atividade contrátil é denominado acoplamento excitação-contração (AEC). A atividade elétrica é o fenômeno que desencadeia a atividade contrátil, e, portanto, sempre a precede (Figura 1.1).

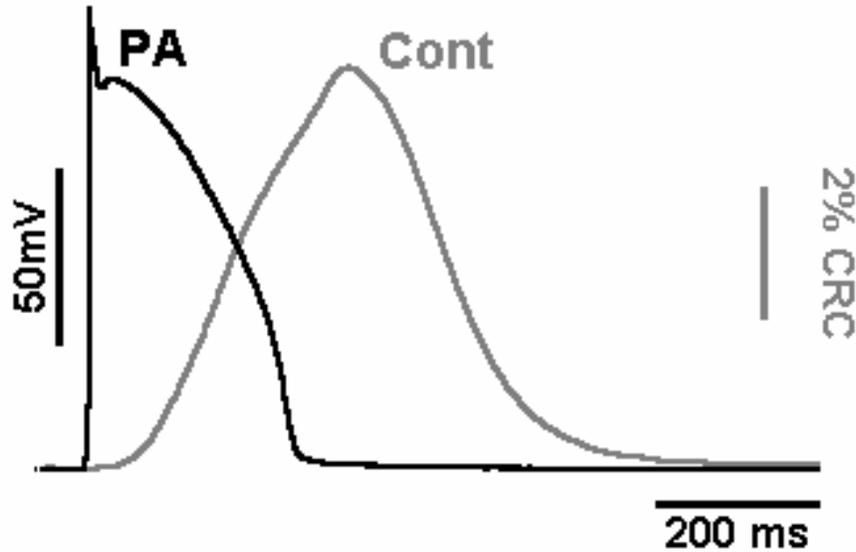


Figura 1.1: Relação temporal entre o potencial de ação (PA) e a contração (Cont) em um miócito ventricular de coelho. A contração (encurtamento sem carga externa) está expressa como porcentagem do comprimento de repouso da célula (CRC). Modificado de Bers (2001).

A Figura 1.2 ilustra os principais mecanismos celulares participantes no AEC e no relaxamento. Durante o PA, Ca^{2+} entra na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão elétrica presentes no sarcolema. O Ca^{2+} que entra, além de ativar diretamente os miofilamentos (MF), interage com os sítios de ligação de Ca^{2+} dos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), provocando sua abertura e liberação de grande quantidade deste íon. A concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) eleva-se de 100 nM para aproximadamente 1 μM . Quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, a ligação do íon aos miofilamentos gera o processo de desenvolvimento de força e encurtamento (Bers, 2001). Para que o relaxamento ocorra, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve ser reduzida. A maior parte do íon, a mesma que foi liberada pelo RS, é recaptada para o RS via uma ATPase de Ca^{2+} (esta recarga é fundamental para a manutenção da carga de Ca^{2+} na organela e da amplitude das contrações em regime permanente), e parte é transportada para fora da célula pelo mecanismo de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Este último é responsável pela extrusão da maior parte do Ca^{2+} que entra na célula via canais de Ca^{2+} do sarcolema (Bassani *et al.*, 1992, 1994; Trafford *et al.*, 1997; Bers, 2001).

A recaptação de Ca^{2+} pelo RS e a extrusão de Ca^{2+} via NCX são considerados os mecanismos rápidos para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. No ventrículo de rato, a ATPase de Ca^{2+} do RS é responsável por ~90% do total de Ca^{2+} transportado durante o relaxamento, enquanto que a NCX transporta cerca de 7%, e 2% é transportado pelo conjunto dos

chamados mecanismos lentos, o *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+} e a ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (Bassani *et al.*, 1992, 1994, 2002; Bassani & Bassani, 2003).

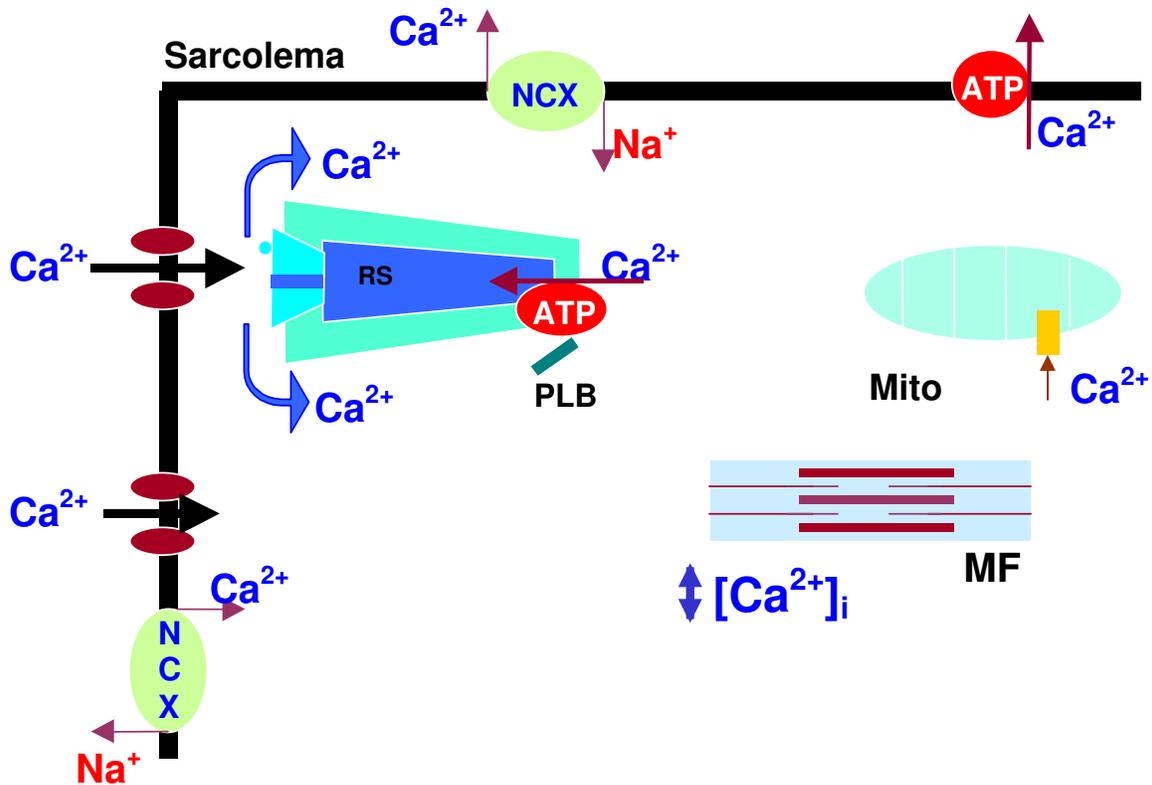


Figura 1.2: Principais mecanismos participantes no acoplamento excitação-contração e relaxamento da célula cardíaca: retículo sarcoplasmático (RS); mitocôndria (Mito); troca sódio-cálcio (NCX); ATPase de Ca^{2+} (ATP); miofilamentos (MF).

O coração pode apresentar alterações do seu ritmo cardíaco normal, as chamadas arritmias, causadas, por exemplo, por doenças coronarianas, doença de Chagas, doenças congênitas do sistema cardiovascular, ou eventos como acidentes traumáticos e choques elétricos. As arritmias afetam a eficiência da ação bombeadora do coração, podendo ser letais (Opie, 1998; American Heart Association, 2004).

A estimulação por campos elétricos (**E**) de alta intensidade vem sendo utilizada no combate às arritmias cardíacas (marca-passos e cardioversores/desfibriladores), contudo, pode causar efeitos indesejados sobre o coração (depressão da função contrátil, necrose do tecido, distúrbios na condução do PA e outras alterações eletrofisiológicas), como já relatados *in vivo* (Dahl, *et al.*, 1974; Avitall, *et al.*, 1990; Yabe

et al., 1990; Li *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1993; Gazmuri *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1997), em preparações miocárdicas multicelulares (Soares, 2003) e em células cardíacas isoladas (Jones *et al.* 1978; 1987; Krauthamer & Jones, 1997; Cheng *et al.*, 1999; Cheek & Fast, 2004; Oliveira, 2004).

Um dos fenômenos celulares relacionados com esses efeitos indesejados e lesão celular denomina-se eletroporação ou eletropermeabilização da membrana celular, causada por campos elétricos de alta intensidade (Tung, 1996; Weaver & Chizmadzhev, 1996b). A eletroporação acaba tornando mais difícil uma nova desfibrilação, reduz a eficiência contrátil (Malmivuo & Plonsey, 1995) e gera um “período refratário” no qual a preparação deixa de responder aos estímulos (Yabe *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991; Krauthamer & Jones, 1997). Em contrapartida aos efeitos danosos da estimulação por campos elétricos de alta intensidade até aqui descritos, Al-Kadra *et al.* (2000) observaram que a aplicação de campos elétricos de alta intensidade (3x o limiar de desfibrilação) a corações de coelho *in vitro* inibe a indução de fibrilação. Krassowska (1995) defende que uma eventual formação de poros na membrana de células cardíacas induzida pela desfibrilação (fenômeno denominado de eletropermeabilização ou eletroporação) pode apresentar efeito benéfico, uma vez que os poros gerados pelo estímulo limitam o aumento da despolarização induzida pelo choque elétrico, protegendo a célula.

Considera-se que a eletroporação consista na desestabilização da bicamada de fosfolípidios da membrana plasmática, tornando-a permeável a íons e moléculas polares (aos quais, em condições normais, em membrana é praticamente impermeável), devido à aplicação de uma grande diferença de potencial. A desestabilização da bicamada de fosfolípidios acaba por facilitar a formação de poros hidrofílicos (que permitem a passagem de íons e moléculas polares, Figura 1.3) a partir de poros hidrofóbicos (que não permitem a passagem de partículas polares, Figura 1.3) já existentes à temperatura ambiente (Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; Smith *et al.*, 2004).

Uma maneira de submeter a membrana a uma grande diferença de potencial é a aplicação de campos elétricos de alta intensidade (Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; DeBruin & Krassowska, 1999). O gradiente de potencial formado na membrana fornece energia aos dipolos elétricos das moléculas de fosfolípidios, diminuindo assim a barreira energética necessária para a transformação do poro hidrofóbico em hidrofílico (Figura 1.4, Weaver 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a). Os poros hidrofílicos não são necessariamente permanentes, mas podem se desfazer espontaneamente (Tsong, 1991). Todo o processo, desde a abertura dos poros hidrofílicos até seu fechamento, demora de

segundos a minutos, para pulsos estimulatórios com duração na faixa de μs a ms e intensidade de 150 a 2000 V/cm (Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999). No entanto, a eletroporação pode ser irreversível. Quanto maior é o módulo do potencial transmembrana (V_m) resultante da aplicação do campo externo, maior é a probabilidade da abertura de poros hidrofílicos, maiores são os seus raios, e menor é a probabilidade de fechamento (Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; Smith *et al.*, 2004). Para uma revisão detalhada sobre eletroporação, sugere-se consultar Weaver *et al.* (1996b).

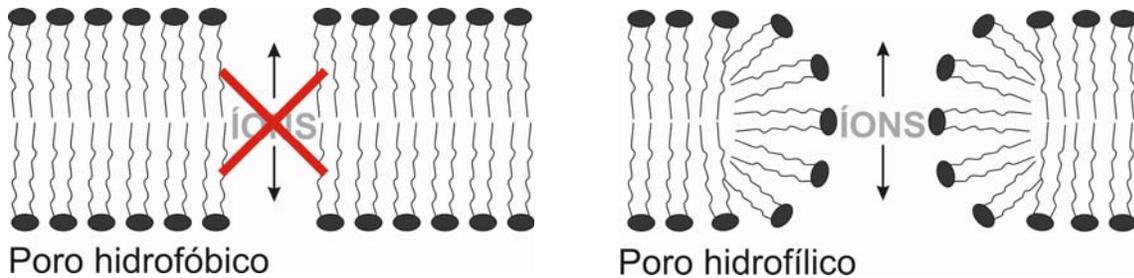


Figura 1.3: Poros da membrana plasmática, dos tipos hidrofóbico (que não permite a passagem de íons) e hidrofílico (que permite a passagem de íons). Modificado de Oliveira 2004.

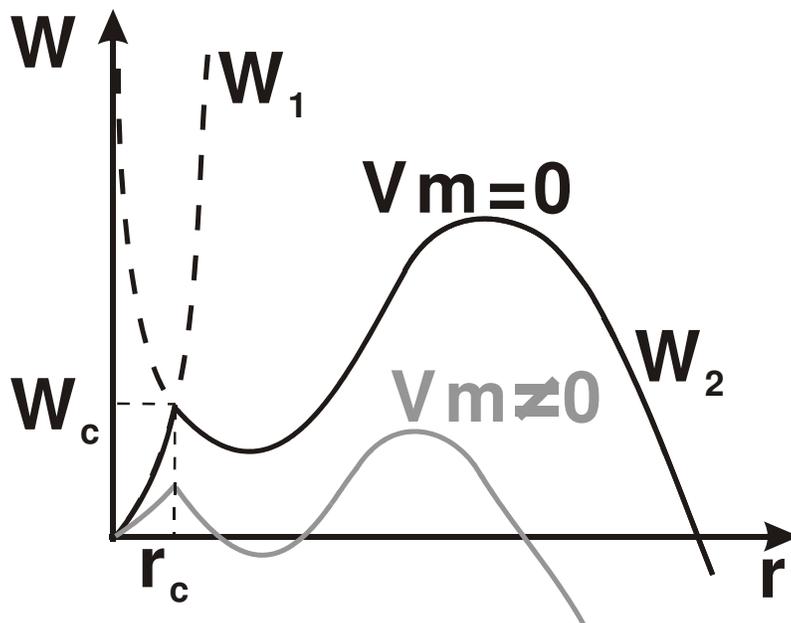


Figura 1.4: Energia livre (W) dos poros hidrofóbicos (W_1) e hidrofílicos (W_2) em relação ao raio dos poros (r) e o potencial transmembrana (V_m). W_c é a barreira de energia que se opõe à formação do poro hidrofílico, e r_c é o raio crítico para conversão do poro de hidrofóbico em hidrofílico. A figura apresenta dados qualitativos. Modificado de Weaver & Chizmadzhev (1996a).

Evidência de que ocorre eletroporação em células submetidas à estimulação por campos de alta intensidade foi observada por Jones *et al.* (1987) em cultura de células cardíacas de embrião de galinha, que desenvolveram microlesões temporárias de 45-65 Å na membrana celular após aplicação de pulsos de 100 a 200 V/cm. Cheek & Fast (2004) observaram em cultura de células cardíacas de rato que, após estimulação com campos maiores que 23 V/cm, as células tornavam-se permeáveis ao indicador fluorescente iodeto de propídio.

Acredita-se que a lesão irreversível de células cardíacas se deva principalmente ao aumento do influxo de íons Ca^{2+} através dos poros não seletivos (Tung *et al.*, 1994; Krauthamer & Jones, 1998), causando sobrecarga de Ca^{2+} . É importante lembrar que a sobrecarga de Ca^{2+} pode gerar atividade espontânea em miócitos (fonte potencial de arritmias) e levar à morte celular (Günter *et al.*, 1994; Bassani *et al.*, 1997; Bers, 2001; Bassani & Bassani, 2003). Porém, apesar da eletroporação ser uma consequência indiscutível da aplicação de campos de alta intensidade, ainda não está confirmado se a sobrecarga de Ca^{2+} celular, que dispara o processo depressão contrátil e/ou de morte celular, resulta da entrada do íon unicamente através dos eletroporos. Influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} e da NCX do sarcolema, e fluxo de Ca^{2+} para o citosol a partir do RS e das mitocôndrias podem também contribuir para esta sobrecarga de Ca^{2+} .

Por outro lado, o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é necessário para o re-selamento, mecanismo de reparo da membrana, que consiste na incorporação de um *patch* de membrana à superfície da membrana celular rompida por meio de um processo de exocitose ativado pela entrada de Ca^{2+} . Este processo de reparo é semelhante ao utilizado por células secretoras, e é fortemente dependente da proteína quinase C (PKC) (McNeil & Steinhardt, 2003). A proteína quinase A (PKA) também parece contribuir para este processo, pois estimula a secreção de insulina em células beta pancreáticas (Lee *et al.*, 2003; Yang & Gillis, 2004; Shimono *et al.*, 2005), e potencializa o auto-reparo de células de córnea de coelho perfuradas mecanicamente (Shen & Steinhardt, 2005). Portanto, ao mesmo tempo em que o influxo de Ca^{2+} dispara a citólise, ele também é necessário para o reparo dos poros abertos pela eletroporação. Assim, o estudo destes processos em células cardíacas torna-se necessário para identificar fatores que afetem a vulnerabilidade das células miocárdicas aos efeitos deletérios do choque, com o objetivo de procurar contribuir para o desenvolvimento futuro de protocolos de estimulação menos agressivos, bem como de procedimentos de proteção ou “blindagem” farmacológica do coração a ser desfibrilado.

Um modo de proteger os miócitos cardíacos de **E** de alta intensidade é a utilização de formas de onda bipolares, que têm se mostrado mais efetivas e menos lesivas em choques do tipo desfibrilatório (Faddy *et al.*, 2003). Mas a razão da menor produção de efeitos deletérios precisa ser melhor investigada: ela pode se dever tanto a queda do limiar de desfibrilação, quanto a menor efeito lesivo intrínseco do pulso bipolar.

A proposta geral deste trabalho é estudar a resposta de miócitos cardíacos isolados de ventrículos de ratos adultos à estimulação com campos elétricos de alta intensidade, buscando esclarecer os mecanismos envolvidos nos processos de depressão contrátil e de morte celular decorrentes da estimulação. Um aspecto importante da abordagem a ser feita é a busca não só dos mecanismos, mas também de uma visão mais integrativa do fenômeno, buscando possíveis condições de proteção miocárdica ao choque.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

1. Estudar o papel do RS, das mitocôndrias, da NCX e de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes de membrana na depressão contrátil e morte de miócitos cardíacos submetidos a campos elétricos de alta intensidade;
2. Investigar se a forma de onda do estímulo elétrico de alta intensidade (mono ou bipolar) afeta a sensibilidade celular ao efeito letal de **E**;
3. Investigar condições que possam modificar a vulnerabilidade celular à lesão letal por **E** (e.g, estimulação β -adrenérgica *in vitro* e indução de *stress in vivo*).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (4-7 meses), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB/UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, em ambiente climatizado, recebendo água e ração *ad libitum*, em regime de iluminação de 12:12 horas. Os animais não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP (protocolos No. 633-1, 774-1, 949-1 e 1185-1; nos casos de indução de *stress* por imobilização e choque na pata, os protocolos foram 776-1 e 951-1, respectivamente).

3.2 – SOLUÇÕES

Na composição das soluções, as concentrações dos solutos estão apresentadas em mM. As soluções foram preparadas com água do tipo I e sais de padrão analítico. Exceto pelo thapsigargin (adquirido de Calbiochem, San Diego, CA, EUA), os fármacos foram adquiridos da Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EUA. As soluções estoques dos fármacos foram armazenadas a -20 °C e diluídas antes de cada experimento.

Solução de Krebs-Henseleit sem cálcio (mM): 115 NaCl; 4,6 KCl; 1,2 KH₂PO₄; 2,4 MgSO₄; 25 NaHCO₃; 11,1 glicose; pH 7.4 sob borbulhamento com 95% O₂, 5% CO₂.

Solução de Tyrode (NT) (mM): 140 NaCl; 6 KCl; 1,5 MgCl₂.6H₂O; 1 CaCl₂.2H₂O; 10 ácido hidroxietilpiperazina-N''-2 etanosulfônico (HEPES); 11,1 glicose (pH 7,4 ajustado com NaOH).

Solução cardioplégica (GLUT) (mM): 30 KCl; 10 KH₂PO₄; 1 MgCl₂.6H₂O; 10 HEPES; 11 glicose; 20 taurina; 70 ácido glutâmico (pH 7,4 ajustado com KOH).

Solução despolarizante (Tyr-K): semelhante à solução NT, porém foi feita substituição equimolar (124 mM) de NaCl por KCl ([KCl] final = 130 mM)

Solução NT sem cálcio (Tyr-0Ca): semelhante à solução NT, porém CaCl₂ foi substituído por MgCl₂ de modo equimolar, e adicionou-se 1 mM de ácido etileno-glicol-bis(β-aminoetil-eter)-N,N,N',N' tetracético (EGTA).

Solução NT sem cálcio e sódio (Tyr-00): nesta solução, foi efetuada substituição equimolar de NaCl por cloreto de colina e de CaCl₂ por EGTA (pH 7,4 ajustado com KOH). A concentração de KCl foi ajustada para que a concentração final de K⁺ (KCl + KOH) fosse 6 mM.

Solução de indo-1: composta de: a) 10 μl de solução 10 mM de indo-1 AM (acetoximetil-ester, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). b) 10 μl de solução 2% (v/v) de *Pluronic* (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) dissolvido em DMSO (*Pluronic* é um agente dispersante que facilita a difusão do indo-1 para o interior da célula); e c) 980 μl de NT (concentração final de indo-1 foi 10 μM).

Soluções de cloridrato de (-) isoproterenol (ISO): uma solução estoque de 20 mM foi preparada em água, contendo 10 mM de ácido ascórbico. Imediatamente antes do uso, esta solução foi diluída em NT para concentração final de 10 nM.

Soluções de cloridrato de (±) verapamil: a solução estoque de 5 mM, preparada em água, foi diluída em NT ou Tyr-00 antes do uso para a concentração final de 5 μM.

Soluções de thapsigargin (TG): A solução estoque de 10 mM foi preparada em DMSO, e diluída em Tyr-00, para a concentração de 5 μM.

Soluções de carbonil-cianeto p-(tri-fluorometoxi)-fenil-hidrazona (FCCP): A solução estoque foi preparada usando-se DMSO como solvente, na concentração de 1 mM, e diluída em NT para a concentração de 1 μM.

3.3 – MIÓCITOS VENTRICULARES

Os miócitos ventriculares foram isolados por digestão enzimática do coração, conforme descrito por Bassani *et al.* (1992) e Bassani & Bassani (2002). Resumidamente, o coração foi perfundido a 37 °C em sistema de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit sem cálcio por 5 min. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,5-0,8 mg/ml de colagenase 1 (Worthington Biochem. Corp., Freehold, NJ, EUA) por 12 – 20 min. Procedeu-se então à perfusão com NT sem Ca²⁺ por 4 min. Em seguida, o ventrículo esquerdo foi isolado e triturado na solução GLUT, para dissociação das células. A suspensão de células foi submetida a repetidas lavagens com solução GLUT.

3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

3.4.1 Set-up experimental para determinação das curvas de letalidade

A Figura 3.1 ilustra o diagrama de blocos da montagem experimental, desenvolvida durante o período de iniciação científica (Ricardo *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2004). Os miócitos foram depositados na câmara de perfusão desenvolvida no CEB/UNICAMP (vide detalhes em Oliveira, 2004). Esta câmara, construída em acrílico transparente, possibilita a perfusão dos miócitos com fluxo em regime laminar. A estimulação elétrica é feita por dois eletrodos de platina, fixados paralelamente ao fluxo da solução e apoiados sobre o fundo da câmara. Isto permite uma distribuição uniforme do campo elétrico (E) no seu interior, permitindo aproximar o arranjo a um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes, 1997; Oliveira, 2004), no qual o campo é dado pela expressão 3.1:

$$E = V/d \quad [3.1]$$

onde V é a tensão elétrica (em V) aplicada aos eletrodos, e d é a distância (em cm) entre os eletrodos (no presente caso, d=0,75 cm).

Os miócitos eram iluminados por um diodo emissor de luz de alta intensidade (Super Bright LED, Jumbo, 5000 mcd, 1,85 V, 20 mA, fabr. Archer, N. Cat. 276 - 086). Sua imagem era ampliada por uma objetiva (mod. Plan 32, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), refletida em um prisma e projetada no dispositivo CCD (*charge coupled device*) de uma câmera de vídeo (mod. ICD-31, Ikegami Tsushinki Co., Tóquio, Japão). O sinal de vídeo era enviado a um aparelho gravador de vídeo cassete (VCR, mod. NV-

SJ405BR, Panasonic, Manaus, AM), cuja saída estava conectada a um detector de borda de sinal de vídeo (DBV, desenvolvido no CEB/UNICAMP, patente registrada sob o nº 300.834-7). O sinal de tensão elétrica gerado pelo DBV, correspondente ao encurtamento celular durante a contração, era enviado a um sistema de aquisição de dados (SAD), composto de uma placa de aquisição de dados USB (USB-6008, National Instruments Co., Budaörs, Hungria) e por um microcomputador (Pentium Dual Core, 2,8 GHz com 2 GB de RAM e 230 GB de HD), onde os dados eram armazenados. Pelo monitor de vídeo (mod. KBM 1200S, Kodo, Ilhéus, BA), era possível visualizar os miócitos, que foram estimulados eletricamente pelo estimulador de baixa potência (EBP, desenvolvido no CEB/UNICAMP), que fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares simétricos; 0-15 V; 0,1-10 Hz; 0,1-10 ms de duração), ou pelo estimulador de alta potência (EAP, desenvolvido no CEB/UNICAMP, patente registrada sob o nº MU8500794-3, Moura *et al.*, 2004), que fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares simétricos; 0-150 V; 0,1-10 Hz; 0,1-10 ms de duração), de acordo com a posição do comutador (desenvolvido no CEB/UNICAMP). O sinal gerado pelos estimuladores era medido pelo osciloscópio digital (OSC, mod. DSO3062A, Agilent Technologies Inc., Pequim, China). Além disso, desenvolvemos programas para analisar o encurtamento (Apêndice-A, item A.1.1) e para gerar o encurtamento a partir de um arquivo digital de vídeo (Apêndice-A, item 1.3), extensão avi, e um novo DBV microcontrolado (Apêndice-A, item A.2).

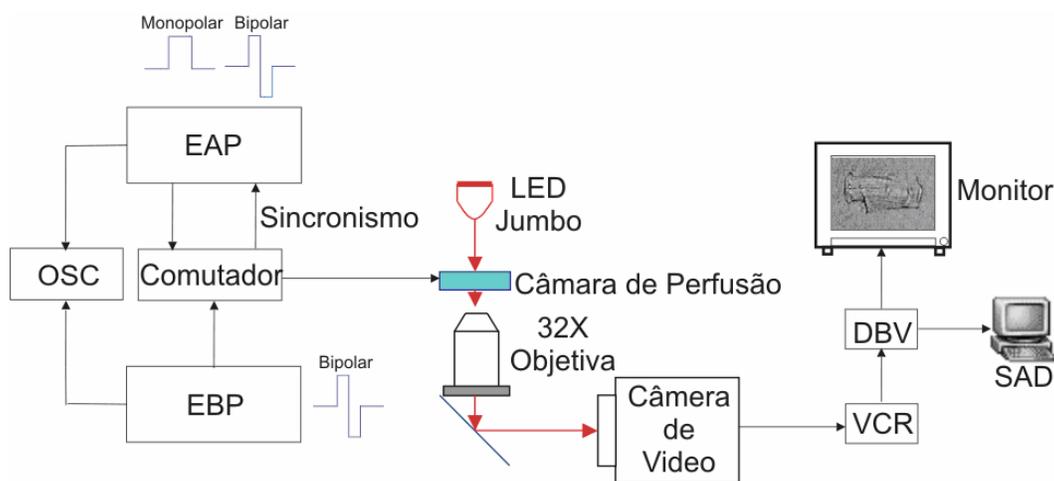


Figura 3.1: Diagrama de blocos da montagem experimental: estimulador de baixa potência (EBP); estimulador elétrico de alta potência (EAP); osciloscópio digital (OSC); aparelho gravador de vídeo cassete (VCR); detector de borda de sinal de vídeo (DBV); sistema de aquisição de dados (SAD). A forma de onda do estímulo está apresentada na figura próxima do bloco que representa o estimulador correspondente. Modificado de Oliveira (2004).

3.4.2 Set-up experimental para medição da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)

Este *setup* está ilustrado na Figura 3.2. Seus elementos são semelhantes aos descritos anteriormente, exceto pelo uso de um microscópio invertido (descrito no item A) e de um sistema de medição de fluorescência (descrito no item B). Usou-se outro modelo de câmara de perfusão (CEB/UNICAMP, patente registrada sob o nº PI 0302.403-2), que é semelhante à anterior, exceto pelo modo de fixação dos eletrodos de estimulação, que tem disposição perpendicular ao fundo da câmara. Neste caso, **E** não é uniforme e, portanto, não foi calculado, mas expresso como múltiplo do valor limiar.

A) Microscópio Invertido (mod. Diaphot 300, Nikon Corp., Tóquio): Todo o sistema de medição de fluorescência tem um microscópio invertido como base. Além de sua utilização para visualização direta dos miócitos cardíacos, o microscópio conta com saída lateral para acoplamento do fluorímetro e câmera, e entrada de epifluorescência por meio de fibra óptica.

B) Sistema de Medição de Fluorescência (SMF, Figura 3.2): O SMF é baseado em um sistema de fluorescência comercial (mod. RatioMaster, Photon Technology International, Inc., PTI, Monmouth Junction, NJ). O indicador de Ca^{2+} (indo-1) é excitado com luz na faixa do ultravioleta (UV), proveniente de uma lâmpada de arco de Xe de 75 W (mod. UXL-75XE, Ushio Inc., Tóquio, Japão), localizada em compartimento separado (iluminador, não mostrado na figura). Após passar por um monocromador (pico em 360 nm), a luz é conduzida até o microscópio por uma fibra óptica, e passa por um filtro de interferência (pico em 360 nm). Para minimizar os efeitos nocivos à célula da iluminação UV, é utilizado um obturador (*shutter*), localizado entre a fonte de luz e o monocromador.

A fluorescência emitida pelo indicador passa pela objetiva, é refletida pelo prisma e separada pelo cubo óptico. Este cubo é composto de um espelho dicróico (que separa as faixas de comprimentos de onda) e dois filtros de interferência (com picos em 405 nm e 485 nm). A emissão em cada comprimento de onda é registrada em tubos fotomultiplicadores separados (PMT₄₀₅ e PMT₄₈₅). A iluminação das células foi feita com luz vermelha (Figura 3.2, traçado vermelho), a imagem ampliada da célula foi projetada na câmera de vídeo (Figura 3.2, CCD), após ser refletida pelo dicróico refletor de vermelho.

Os sinais provenientes das PMT (tensão elétrica proporcional à intensidade luminosa) e do DBV (tensão elétrica proporcional à amplitude da contração celular) são enviados a uma interface analógico-digital (PTI, Monmouth Junction, NJ, EUA) controlada pelo

programa Felix (versão 1.1, PTI, Monmouth Junction, NJ, EUA). A taxa de aquisição dos sinais foi de 50 Hz e apenas o sinal de fluorescência passou por filtragem digital utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964), com *buffer* igual a 15.

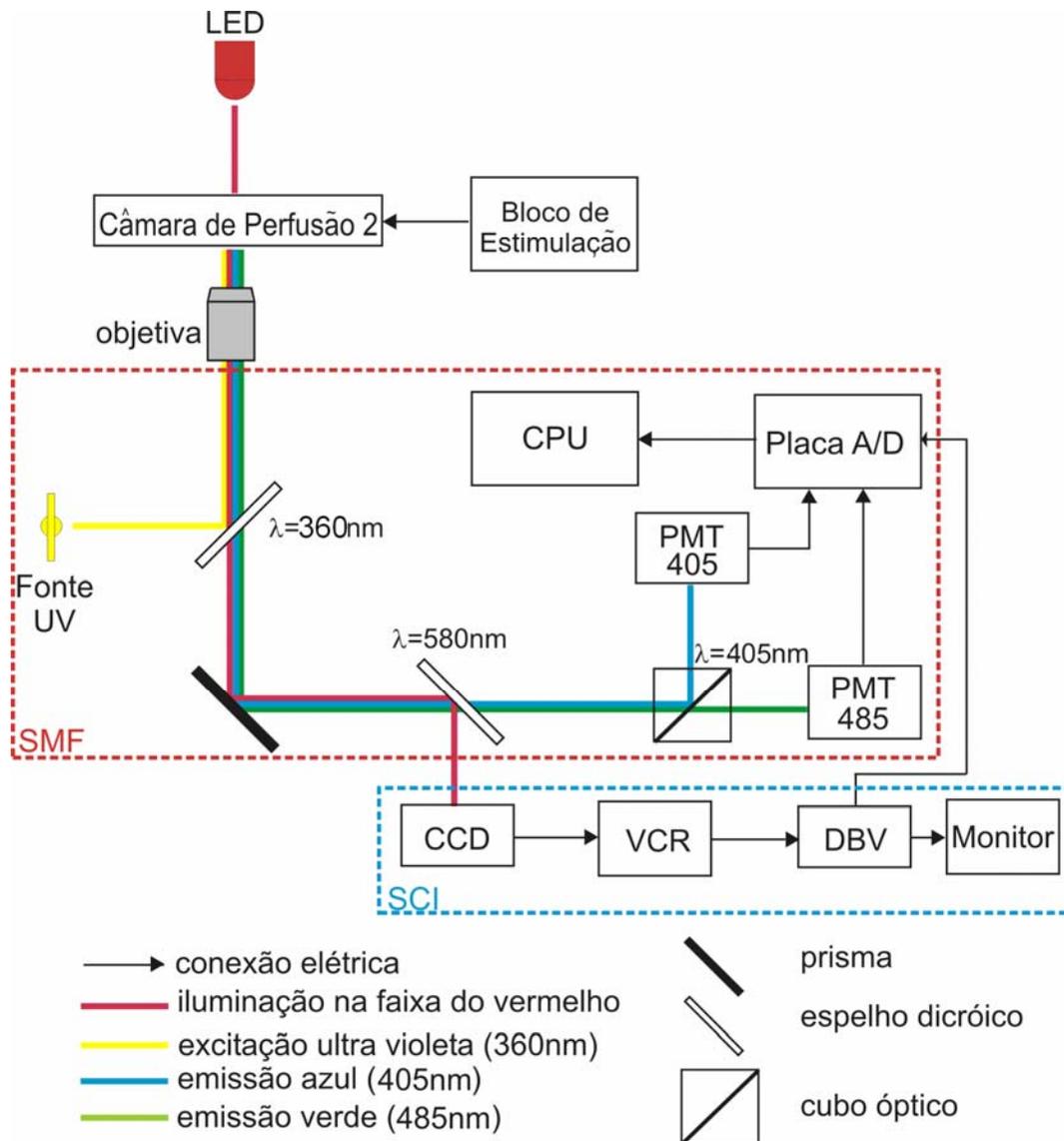


Figura 3.2 – *Set-up* experimental – SCI: sistema de captação de imagens; câmera de vídeo CCD (*coupled charged device*); VCR: aparelho gravador de vídeo cassete; DBV: detector de borda de sinal de vídeo; Monitor: monitor de vídeo; SMF: sistema de medição de fluorescência; PMT₄₀₅ e PMT₄₈₅: fotomultiplicadoras para monitoração dos sinais luminosos em 405 e 485 nm, respectivamente; Placa A/D: placa conversora de sinal analógico em digital; CPU: computador; Bloco de estimulação: estimulador de alta potência, estimulador de baixa potência e comutador. Em cada espelho dicróico está apresentado o comprimento de onda de reflexão (λ). Modificado de Ricardo (2005).

3.5 - MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE Ca^{2+}

Utilizamos o indicador ratiométrico indo-1 para medir $[Ca^{2+}]_i$. Os indicadores ratiométricos são assim chamados pois permitem o uso da razão entre a emissão em 2 comprimentos de onda (ou em um único comprimento de onda sob excitação em 2 comprimentos de onda) para estimar $[Ca^{2+}]_i$. Este método tem como principal vantagem a diminuição de erros de medida causados por variação da concentração do indicador no interior da célula, intensidade da iluminação de excitação e ganho da medição da fluorescência, assim como artefatos de movimento (Gomes *et al.*, 1998). As principais características espectroscópicas do indo-1 são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Principais características espectroscópicas do indicador fluorescente indo-1. EQ: eficiência quântica; CE: coeficiente de extinção ($M^{-1} cm^{-1}$); “livre” significa indicador não ligado ao Ca^{2+} e “ligado” significa indicador ligado ao Ca^{2+} (modificado de Minta *et al.*, 1989; Grynkiewicz *et al.*, 1985).

K_d (nM)	Pico de Excitação (nm)	Pico de Emissão (nm)	EQ (livre)	EQ (ligado)	CE (livre)	CE (ligado)
250 ^a	349	485/405	0,38	0,56	79	83

^a K_d aparente *in vitro* determinado a 37°C, em solução aquosa (110 mM KCl, pH 7,05)

Para carregar os miócitos com o indicador, as células foram incubadas com solução de indo-1 em NT por 15 min, e, a seguir, perfundidos com solução NT por 20 min para lavagem e deesterificação do indicador. O indicador na forma éster entra na célula durante a incubação, e é deesterificado por esterases celulares durante a lavagem, resultando na sua forma ácida, que não é lipossolúvel e, portanto, permanece presa no interior da célula.

Para que seja possível a análise dos transientes de Ca^{2+} no interior da célula, é necessário converter o sinal de fluorescência medido em concentração de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) por meio da equação 3.2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = k_d \beta \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \quad [3.2]$$

onde R é a razão de fluorescência nos comprimentos de onda 405 e 485 nm; R_{\min} e R_{\max} são os limites superior e inferior de R, respectivamente (i.e., R em $[Ca^{2+}]$ virtualmente zero

e saturante, respectivamente); K_d é a constante de dissociação aparente do indo-1; β é a razão das intensidades de fluorescência medidas em $\lambda = 485$ nm, com $[Ca^{2+}]_i$ mínima e saturante. Embora não utilizado neste trabalho, a partir da experiência de uso do software Felix (vide item 3.4.2-B), desenvolvemos um programa que converte o sinal de fluorescência medido em $[Ca^{2+}]_i$ que vem sendo usado em trabalhos mais recentes, mostrando ser mais eficiente e fácil de se manipular (Apêndice-A, item A.1.2).

Todos os valores de R foram calculados após subtração, em cada comprimento de onda de emissão, da fluorescência emitida por um campo vazio adjacente à célula e de igual área (fluorescência de fundo).

R_{min} e R_{max} foram determinados segundo Bassani *et al.* (1994), com pequenas modificações do protocolo. Inicialmente, as células foram perfundidas com solução NT,0Ca por 20 min, com aplicação de 10 mM de cafeína dissolvida na mesma solução a cada 5 minutos, para depletar o estoque de Ca^{2+} do RS. Em seguida, a solução foi trocada pela mesma solução contendo 7 mM de EGTA (quelante de Ca^{2+} utilizado para reduzir o Ca^{2+} contaminante da solução para níveis nanomolares). Após 5-10 min, registrou-se a fluorescência em aproximadamente 30 células para cálculo de R_{min} . A seguir, adicionou-se à solução 20 mM de Ca^{2+} , a fim de elevar $[Ca^{2+}]_i$ para valores saturantes. Após estabilização, registrou-se a fluorescência em aproximadamente 30 células para cálculo de R_{max} . Para a calibração, R_{min} e R_{max} foram considerados como os limites inferior e superior, respectivamente, dos intervalos de confiança para 95% das amostras correspondentes às 10 células com menor valor de R_{min} e às 10 células com maior valor de R_{max} (Gomes *et al.*, 1998).

Para determinar β , utilizou-se a abordagem alternativa proposta por Gomes *et al.*, (1998). Mediu-se a intensidade de fluorescência nos dois comprimentos de onda em três pontos de um transiente de Ca^{2+} típico, incluindo o pico. Após subtração da fluorescência de fundo, ajustou-se uma função linear para descrever a emissão em 405 nm em função daquela a 485 nm, da qual foi obtido o coeficiente angular (a). β foi calculado como:

$$\beta = \frac{R_{max} - a}{R_{min} - a} \quad [3.3]$$

Assumimos o valor de β como a média dos valores determinados em 10 células. O valor de K_d foi considerado como 844 nM, obtido em miócitos ventriculares (Bassani *et al.*, 1995a).

3.6 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Antes do início de cada experimento, a câmara de perfusão e os eletrodos passavam por um processo de limpeza: lavagem com etanol 70%, água deionizada e secagem em estufa (37°C por 30 min). A seguir, uma fina camada de solução de colágeno era aplicada à lamínula no fundo da câmara de perfusão, para melhorar a adesão das células. Após 20 min de secagem, as células eram depositadas na câmara, e um novo período de 20 min era aguardado para sua sedimentação e adesão à lamínula. A preparação era então perfundida com solução NT a 23 °C, à taxa de 2 a 3 ml/min.

As dimensões das células, isto é, seus eixos maior (2c) e menor (2a), foram medidas diretamente no monitor de vídeo, ou, quando usado o microscópio invertido, com o auxílio de um micrômetro ocular.

3.6.1 Determinação do Limiar de Estimulação

O estimulador elétrico de baixa potência (EBP) foi ajustado para produzir pulsos bipolares de tensão elétrica (0,5 Hz, duração de 10 ms no total dos dois semi-ciclos) supralimiais. A seguir, a amplitude do estímulo foi diminuída gradativamente até que a célula parasse de contrair. Considerou-se como amplitude limiar o menor valor de tensão aplicado ao qual as células respondiam com contração. Em seguida, a tensão elétrica foi ajustada para 20% acima do limiar, mantendo-se a estimulação. A partir da tensão elétrica aplicada aos eletrodos, medida no osciloscópio, o campo elétrico aplicado (**E**) pôde ser calculado por meio da expressão 3.1.

3.6.2 Mecanismos envolvidos na depressão contrátil e morte celular

Todos os experimentos realizados com medição de $[Ca^{2+}]_i$ foram realizados em conjunto com a Profa. Dra. Rosana A. Bassani. Nestes experimentos, $[Ca^{2+}]_i$ e contrações foram medidos simultaneamente.

A amplitude dos campos elétricos de alta intensidade foi escolhida com base em estudos anteriores (Oliveira *et al.*, 2003; Oliveira, 2004). Utilizamos a estimulação com pulsos monopares de 20 vezes o limiar estimulatório (probabilidade de letalidade >0,6), e de 12-15 vezes o limiar, que tem uma probabilidade de letalidade baixa (<0,25), porém, costumam causar depressão contrátil reversível bem definida. A aplicação de campos com baixa probabilidade de letalidade nos permite estudar diferentes tratamentos que possam proteger a célula ou potencializar o efeito deletério, assim como estudar os mecanismos envolvidos no processo de depressão contrátil.

As células carregadas com indo-1 foram estimuladas pelo EBP a 0,5 Hz, com estímulos bipolares de baixa potência (1,2 vezes o limiar) durante 5 min, para estabilização. Um pulso de baixa intensidade era substituído por um pulso monopolar de alta intensidade com duração de 10 ms, por meio do comutador, e a estimulação de baixa intensidade era retomada logo a seguir. Após estímulos subletais, um período de 10 a 15 min era aguardado para recuperação da contração e do transiente de Ca^{2+} para o nível anterior à aplicação do pulso de alta intensidade. Observe-se que, nestes experimentos, a estimulação de baixa intensidade não foi interrompida em instante algum, exceto durante a aplicação de um único estímulo de alta intensidade. Este protocolo foi repetido sob várias condições experimentais descritas a seguir.

A) Papel do Ca^{2+} extracelular: Para investigar a possibilidade de que a entrada de Ca^{2+} na célula a partir do meio externo fosse a principal causa da depressão contrátil e morte celular após a aplicação do pulso de alta intensidade (Tung *et al*, 1994; Krauthamer & Jones, 1998), comparamos a resposta das células a estímulos aplicados na presença e ausência de Ca^{2+} extracelular. Após execução do protocolo em solução NT ($[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1 \text{ mM}$) e subsequente estabilização das contrações e transientes de Ca^{2+} , a solução de perfusão foi trocada para Tyr-0Ca ($[\text{Ca}^{2+}]$ contaminante estimada em $1 \mu\text{M}$, Bassani & Bers, 1994), sem interrupção da estimulação basal. Quando contrações e transientes desapareceram (devido à baixa $[\text{Ca}^{2+}]_o$), foi aplicado o pulso de alta intensidade, seguido de retorno à perfusão com NT após um intervalo variável.

B) Influência da NCX na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} : É possível que, mesmo na ausência de Ca^{2+} , o choque cause um grande acúmulo intracelular de Na^+ (e.g., por influxo via eletroporos), o que poderia tornar mais negativo o potencial de reversão do NCX, e assim favorecer a operação deste transportador no modo reverso, levando a considerável influxo de Ca^{2+} quando $[\text{Ca}^{2+}]_o$ fosse retornada a 1 mM. Para investigar esta possibilidade, o pulso de alta intensidade foi aplicado na presença de solução Tyr-00, na qual Na^+ foi substituído por um cátion que não é transportado pelo trocador.

C) Papel de canais de Ca^{2+} tipo L na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} : Outro possível mecanismo de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seria o influxo através de canais de Ca^{2+} tipo L da membrana. Para investigar esta possibilidade, o estímulo de alta intensidade foi aplicado durante perfusão com solução Tyr-0Ca contendo $5 \mu\text{M}$ de verapamil (bloqueador desses

canais). Alguns segundos após o choque, a solução de perfusão foi trocada para NT contendo a mesma concentração de verapamil.

D) Papel do RS na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} : Nestes experimentos, a aplicação do choque de alta intensidade foi repetida após inibição irreversível da ATPase de Ca^{2+} do RS por TG. Para isto, as células foram incubadas com 5 μM de TG em solução Tyr-00 por 3 min (Bassani *et al.*, 1993). Em seguida, após lavagem do TG, 10 mM de cafeína (dissolvida na mesma solução) foi aplicada para depleção do Ca^{2+} que restou na organela. A frequência de estimulação foi reduzida de 0,5 para 0,1 Hz, uma vez que ocorre considerável prolongamento da fase de queda do transiente de Ca^{2+} após tratamento com TG (Bassani *et al.*, 1994; Bassani & Bassani, 2003a). Isto se dá porque a captação de Ca^{2+} pelo RS é responsável por ~90% do total de Ca^{2+} transportado durante o relaxamento em ventrículo de rato (Bassani *et al.*, 1992, 1994; Bassani & Bassani, 2002). Foram consideradas apenas células nas quais foi impossível obter recarga de Ca^{2+} do RS após estimulação elétrica (testada pela aplicação de cafeína), evidenciando inibição total e irreversível da ATPase.

3.6.3 Determinação da Relação entre Intensidade do Campo Elétrico e Letalidade

Neste protocolo, foram selecionadas células cujo eixo maior se orientava na direção longitudinal com relação à direção do **E** aplicado, com um desvio máximo de 5°. Após a determinação do limiar estimulatório, iniciou-se o protocolo de aplicação de pulsos elétricos de alta intensidade (Oliveira, 2004). Este protocolo foi similar ao protocolo anterior, com a diferença de que a estimulação de baixa intensidade não era retomada, logo após a aplicação do estímulo de alta intensidade. Após um período de repouso, a estimulação com o EBP era retomada por cerca de 5 min, seguida de outro pulso de alta intensidade de maior amplitude que o anterior. O protocolo era repetido até a indução de lesão e contratura irreversíveis (morte celular). Os pulsos de alta intensidade tinham amplitude entre 8 e 35 (tipicamente, 8, 12, 16, 20, 25, 30 e 35) vezes o limiar estimulatório.

A) Letalidade de campos elétricos em miócitos despolarizados: Neste experimento, as células não foram expostas à solução NT, mas transferidas diretamente da solução GLUT para a solução despolarizante Tyr-K ($[\text{K}^+]_o = 130 \text{ mM}$). Após 5 min de perfusão com esta solução, o **E** letal foi determinado.

B) Letalidade de campos elétricos durante inibição da captação mitocondrial de Ca^{2+} : As células foram incubadas com FCCP (1 μ M) por 1 min antes e durante a aplicação do pulso de alta intensidade (12 ou 20 vezes o limiar de estimulação).

C) Letalidade de campos elétricos aplicados na forma de pulsos bipolares: O procedimento para determinação do campo elétrico letal foi o mesmo, porém o pulso monopolar de alta intensidade foi substituído por um pulso bipolar simétrico de alta intensidade com duração de 10 ou 20 ms no total dos dois semi-ciclos. A amplitude do pulso bipolar foi considerada como a amplitude de pico, e não pico a pico.

D) Estimulação β -adrenérgica: O valores de **E** limiar e letal foram determinados na presença de 10 nM de ISO (tempo de exposição > 2 min), concentração submáxima para produção de efeito inotrópico positivo em miocárdio de rato (Silveira *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006). Em alguns experimentos, a relação **E** x letalidade foi determinada com aplicação do choque em solução Tyr-0Ca, tanto na ausência, quanto na presença de ISO. Neste caso, após determinação do limiar de estimulação em solução NT, o RS foi depletado de Ca^{2+} por meio da aplicação de 10 mM de cafeína (dissolvida em Tyr-0Ca). A seguir, as células foram perfundidas com Tyr-0Ca, contendo ou não ISO (10mM), por 2 min previamente à aplicação do estímulo de alta intensidade. Cerca de 30 s depois, retornou-se à perfusão com solução NT.

E) Letalidade de campos elétricos após indução de *stress*: O **E** letal foi determinado em miócitos de ratos nos quais foi induzido *stress* por dois modos: a) imobilização: os ratos eram fisicamente contidos por 1 h em um dispositivo imobilizador de acrílico (Silveira *et al.*, 2003; Bassani & Bassani, 2003). b) choque nas patas: os ratos foram submetidos a sessões de 120 choques (1 mA, 1 s de duração, intervalos pseudo-aleatórios, variando entre 5 e 25 s) aplicados ao piso de uma gaiola (Bassani & De Moraes, 1988; Bassani & Bassani, 2003b), durante 30 min. Para cada procedimento, foi aplicada 1 sessão diária por 3 dias. Os miócitos foram isolados logo após a última sessão.

3.7 - DETERMINAÇÃO DA POLARIZAÇÃO INDUZIDA PELO CAMPO ELÉTRICO

Adotamos para a membrana ("casca" dielétrica) do miócito cardíaco o modelo geométrico do esferóide prolato (Figura 5.2), proposto por Klee e Plonsey (1976), para o cálculo do potencial elétrico extracelular (V_e) gerado por **E**. V_e foi calculado a partir das

dimensões celulares ($2a$ e $2c$) e dos valores de \mathbf{E} aplicados. Assim, cada célula foi aproximada por um esferóide descrito pela equação 3.4:

$$x^2/a^2 + y^2/a^2 + z^2/c^2 = 1 \quad [3.4]$$

onde c e a são, respectivamente, os semi-eixos maior e menor do esferóide.

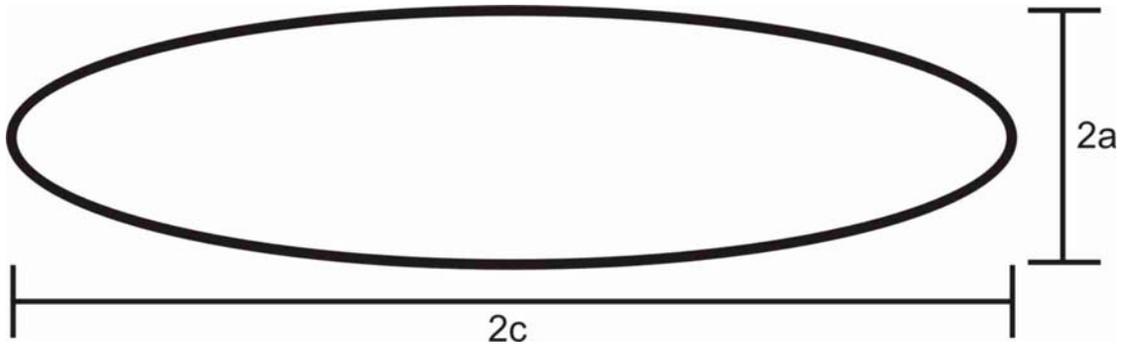


Figura 5.2: Esferóide prolato, no qual $2a$ é o eixo menor e $2c$ o eixo maior.

Um campo $\mathbf{E} = E_{0x} x + E_{0y} y + E_{0z} z$ produz um V_e dado por (Klee & Plonsey, 1976):

$$V_e(x, y, z) = (E_{0x} x + E_{0y} y)A + (E_{0z} z)C \quad [3.5]$$

onde,

$$A = \{1 - 0,5 \epsilon^{-2} - [0,25(1 - \epsilon^2) \ln[(1 - \epsilon)/(1 + \epsilon)]] \epsilon^{-3}\}^{-1} \quad [3.6]$$

$$C = \{\epsilon^{-2} - [0,5(1 - \epsilon^2) \ln[(1 - \epsilon)/(1 + \epsilon)]] \epsilon^{-3}\}^{-1} \quad [3.7]$$

$$\epsilon = (1 - a^2/c^2)^{1/2} \quad [3.8]$$

Restringindo \mathbf{E} ao plano x, z temos:

$$V_e(x, z) = (E_{0x} x)A + (E_{0z} z)C \quad [3.9]$$

Portanto, em células cujo eixo maior se orientava na direção longitudinal com relação à direção do \mathbf{E} aplicado, V_e e V_e máximo (V_{e-max}) são dados pelas equações 3.10 e 3.11, respectivamente.

$$V_e(x, z) = E C z \quad [3.10]$$

$$V_{e-max} = E C c \quad [3.11]$$

Note que V_{e-max} depende do módulo de **E** e de parâmetros puramente geométricos (equações 3.10 e 3.11).

3.8 - PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados estão apresentados como média acompanhada do erro-padrão ou intervalo de confiança para 95% (IC95%).

Os dados da relação entre **E** e letalidade foram analisados pelo programa *Prism* 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), com a ferramenta de cálculo *survival test*. O programa gera tabelas de probabilidade de letalidade em função de **E** (ou V_{e-max}) a partir dos dados primários de cada célula, que foram apresentados da seguinte forma:

<Campo elétrico sub-letal máximo>	0
<Campo elétrico letal>	1

Aos valores da tabela, efetuamos um ajuste não-linear por uma função sigmóide:

$$f(x) = 1 / (1 + 10^{((L50-x)*n)})$$

onde L50 equivale ao valor médio de **E** ou V_{e-max} correspondente a 50% de letalidade (EL50 ou $\Delta V_{e-max}50$, respectivamente) e n é o coeficiente de Hill (Oliveira, 2004).

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado indicativo de significância estatística. Os valores de **E** e V_{e-max} no limiar de estimulação (E_T e ΔV_T , respectivamente) foram comparados por teste *t de Student* ou análise de variância monofatorial. Nas comparações, a não sobreposição dos IC95% foi considerada como indicativa de diferença estatisticamente significativa.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DEPRESSÃO CONTRÁTIL E MORTE CELULAR

Em 12 células estudadas, a amplitude da contração e do transiente de Ca^{2+} médios a 0,5 Hz registrados antes da aplicação do pulso de alta intensidade foram $7,41 \pm 0,97$ % do comprimento celular de repouso (CRC) e $0,575 \pm 0,071$ μM , respectivamente.

A) Papel do Ca^{2+} extracelular:

A Figura 4.1 ilustra o efeito da aplicação de um estímulo subletal de alta intensidade (15x o limiar) sobre o encurtamento celular (Figura 4.1-A) e sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 4.1-B). Pode-se observar que, logo após a aplicação do pulso, ocorreu um aumento sustentado da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica, acompanhado por contratura. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica caiu vagarosamente (ficando acima de $0,4$ μM por ~ 10 s), ao mesmo tempo que ocorreu lento relaxamento. Podemos observar a ocorrência de oscilações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (e contrações fásicas irregulares) durante e após a contratura. A amplitude das contrações evocadas por estímulos de baixa intensidade (*twitches*) e dos respectivos transientes de Ca^{2+} retornou valores comparáveis aos medidos antes da aplicação do pulso teste após cerca de 10 min. Em alguns casos (como o ilustrado na Figura 4.1), observou-se aumento temporário da amplitude desses sinais acima dos valores basais.

Em contraste com a transitoriedade do aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da contratura durante pulsos sub-letais, a resposta à aplicação de pulsos letais consistiu da elevação sustentada de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para níveis supramicromolares, acompanhada de contratura irreversível, como mostrado na Figura 4.2.

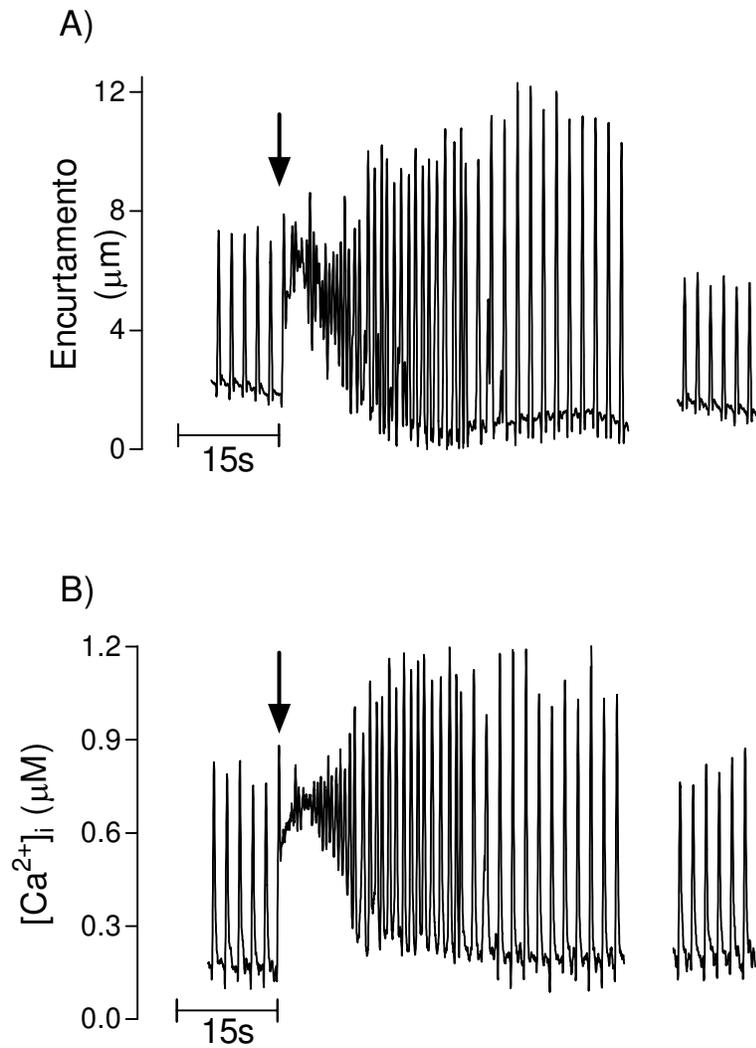


Figura 4.1: Traçados de encurtamento celular (A) e $[Ca^{2+}]_i$ (B) registrados simultaneamente em miócitos ventriculares de rato durante estimulação elétrica. A seta indica a aplicação de um único pulso de alta intensidade (15X o limiar). A recuperação da amplitude da contração e do transiente de Ca^{2+} , que ocorre 10 min após a aplicação do pulso teste, é mostrada a direita (após a interrupção do traçado).

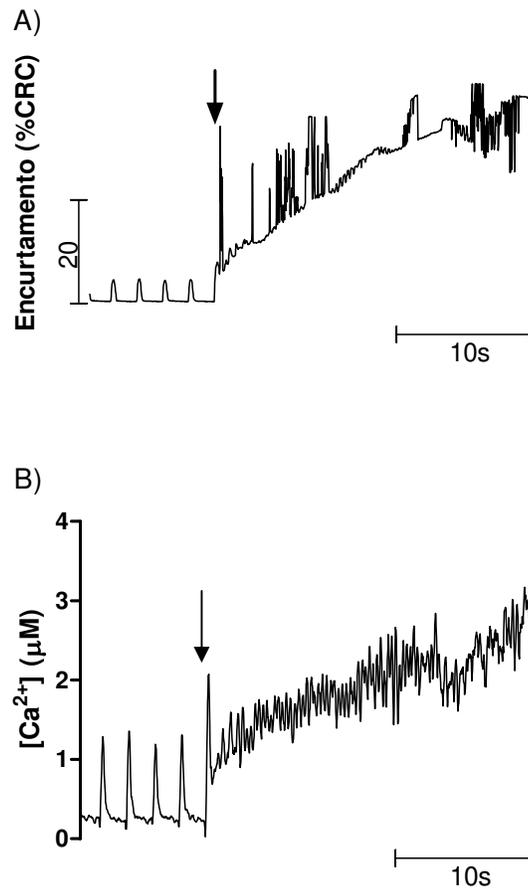


Figura 4.2: Traçados de encurtamento celular (A), expresso como % do comprimento de repouso da célula (CRC), e $[Ca^{2+}]_i$ (B) registrados simultaneamente em miócitos ventriculares de rato durante estimulação elétrica. A seta indica a aplicação de um único pulso de alta intensidade (20 x o limiar).

Para verificar se a entrada de Ca^{2+} na célula estava associada à depressão contrátil ou à morte celular, fizemos experimentos nos quais o estímulo foi aplicado na ausência de Ca^{2+} externo (Figuras 4.3 e 4.4). Quando o pulso de 12x o limiar (subletal) foi aplicado na ausência de Ca^{2+} , não houve modificação de $[Ca^{2+}]_i$, mas ao voltarmos $[Ca^{2+}]_o$ para 1 mM, observamos o aumento sustentado da $[Ca^{2+}]_i$, com posterior recuperação (Figura 4.3-B). Este resultado contrasta com o que ocorreu quando um pulso da mesma amplitude foi aplicado na presença do íon em concentração milimolar: neste último caso, o aumento sustentado de $[Ca^{2+}]_i$ foi imediato em resposta ao choque (Figura 4.3-A).

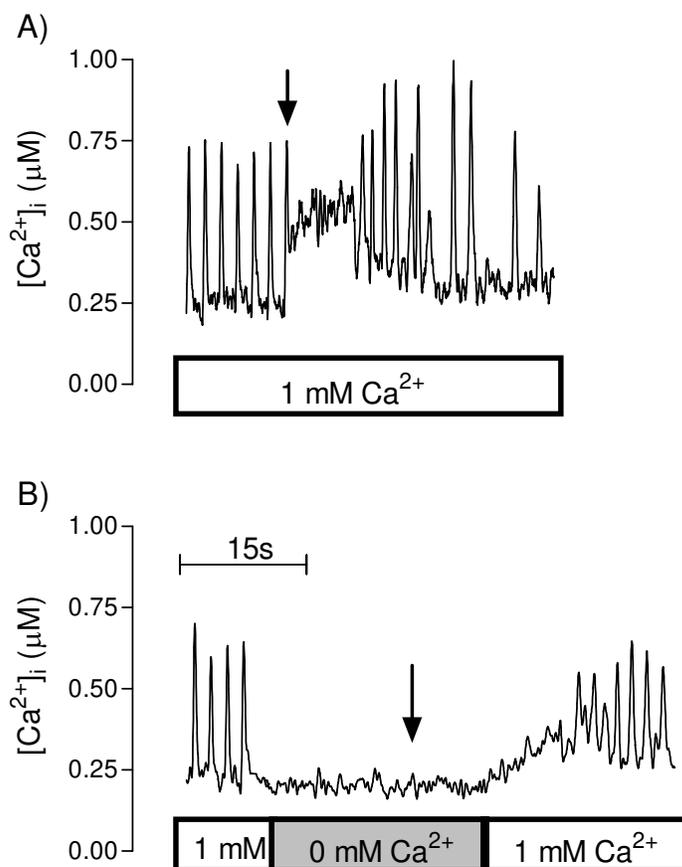


Figura 4.3: Traçados de $[Ca^{2+}]_i$ registrados durante estimulação elétrica. Um pulso de alta intensidade (12x o limiar de estimulação, indicado pela seta) foi aplicado em duas condições: na presença (A) e na ausência (B) de Ca^{2+} externo.

Ao aplicarmos um estímulo conhecidamente letal (20X o limiar) na ausência de Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ também não se alterou. Mas, ao voltarmos o Ca^{2+} externo a 1 mM (~1min após o pulso teste), ocorreu considerável e irreversível aumento de $[Ca^{2+}]_i$, seguido da morte celular (Figura 4.4).

Em alguns experimentos complementares, o choque foi aplicado na presença de solução Tyr-0Ca à qual não havia sido adicionado EGTA. Neste caso, estima-se que a $[Ca^{2+}]_o$ contaminante seja 10 μM (vs. 1 μM na presença de 1 mM EGTA). A resposta ao choque foi semelhante àquela observada na presença de EGTA. Aplicando o choque na presença de valores maiores de $[Ca^{2+}]_o$ (0,1 ou 0,5 mM), observamos que as células apresentam contratura e contrações fásicas irregulares semelhantes àsquelas presentes na presença de 1 mM de Ca^{2+} . Porém, quando o choque foi aplicado na presença de 0,1

mM de Ca^{2+} , as contrações fásicas cessaram somente quando aumentamos Ca^{2+} para 1 mM, enquanto que na presença de 0,5 mM, estas contrações cessaram sem a necessidade de aumento de Ca^{2+} para 1 mM.

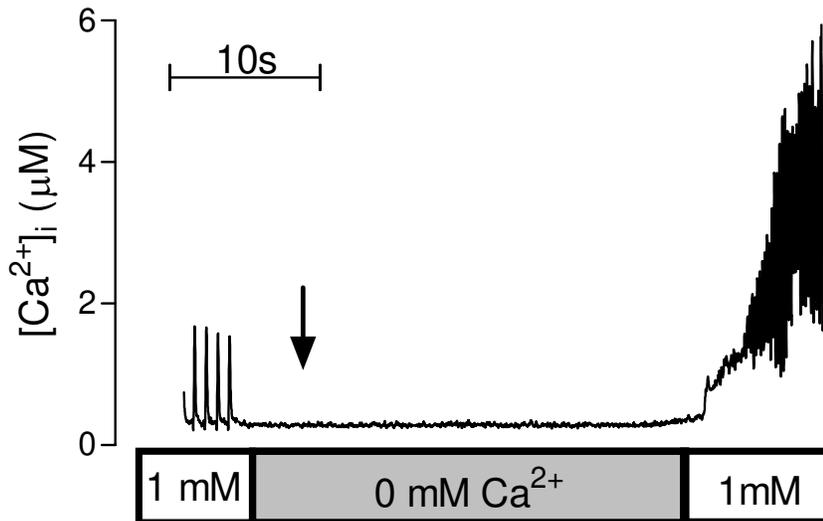


Figura 4.4: Traçados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registrados durante estimulação elétrica. Um pulso de alta intensidade (20x o limiar de estimulação, indicado pela seta) foi aplicado na ausência de Ca^{2+} externo. Após retorno do Ca^{2+} externo, ocorre um aumento seguido de oscilações rápidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

B) Influência da NCX na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} :

Para evitar o acúmulo de Na^+ no citosol após possível permeabilização da membrana induzida pelo pulso de alta intensidade, o que poderia favorecer a operação da NCX no modo reverso e causar aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ quando $[\text{Ca}^{2+}]_o$ fosse retornada a 1 mM, o choque de alta intensidade foi aplicado na ausência de Na^+ externo (Na^+ foi substituído por colina, um cation de massa bem maior). A Figura 4.5-A ilustra a condição controle (pulso aplicado na presença de Na^+ e Ca^{2+} , perfusão com NT), na qual o pulso de alta intensidade (15X o limiar) provocou aumento sustentado da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, com posterior recuperação. A ausência de Na^+ do meio extracelular não impediu o aumento sustentado da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ quando $[\text{Ca}^{2+}]_o$ foi retornada a 1 mM (Figura 4.5-B).

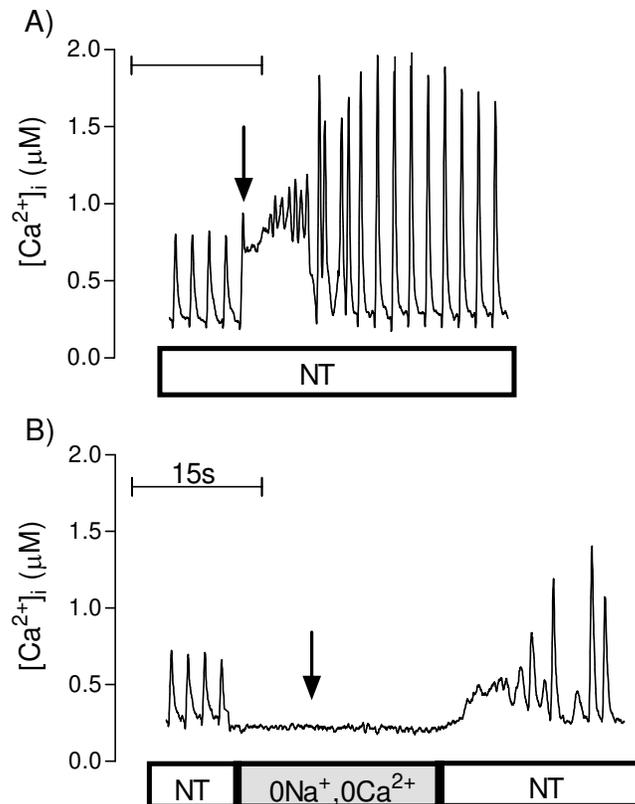


Figura 4.5: Traçados de $[Ca^{2+}]_i$ registrados durante estimulação elétrica.. Um pulso de alta intensidade (15 vezes o limiar de estimulação, indicado pela seta) foi aplicado na presença (A; NT) e na ausência (B; Tyr-00) de Na^+ e Ca^{2+} externos.

C) Papel de canais de Ca^{2+} tipo L na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} :

A Figura 4.6-A ilustra a condição controle, i.e., pulso de alta intensidade (12x o limiar) aplicado na presença de Ca^{2+} , gerando um aumento sustentado da $[Ca^{2+}]_i$, com posterior recuperação. A Figura 4.6-B ilustra a resposta a um pulso da mesma intensidade aplicado na ausência de Ca^{2+} . Como visto anteriormente, $[Ca^{2+}]_i$ permaneceu inalterada após o choque, mas, ao voltarmos o Ca^{2+} extracelular, observamos o aumento sustentado da $[Ca^{2+}]_i$. Na Figura 4.6-C, podemos ver que o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta ao aumento de $[Ca^{2+}]_o$ não foi abolido quando os canais de Ca^{2+} do tipo L do sarcolema foram bloqueados por 5 μM verapamil durante a aplicação do choque e retorno de $[Ca^{2+}]_o$ para 1 mM. As variações fásicas de $[Ca^{2+}]_i$ observadas na presença de verapamil + 1 mM $[Ca^{2+}]_o$ foram oscilações espontâneas que não apresentaram relação temporal com a aplicação dos estímulos elétricos.

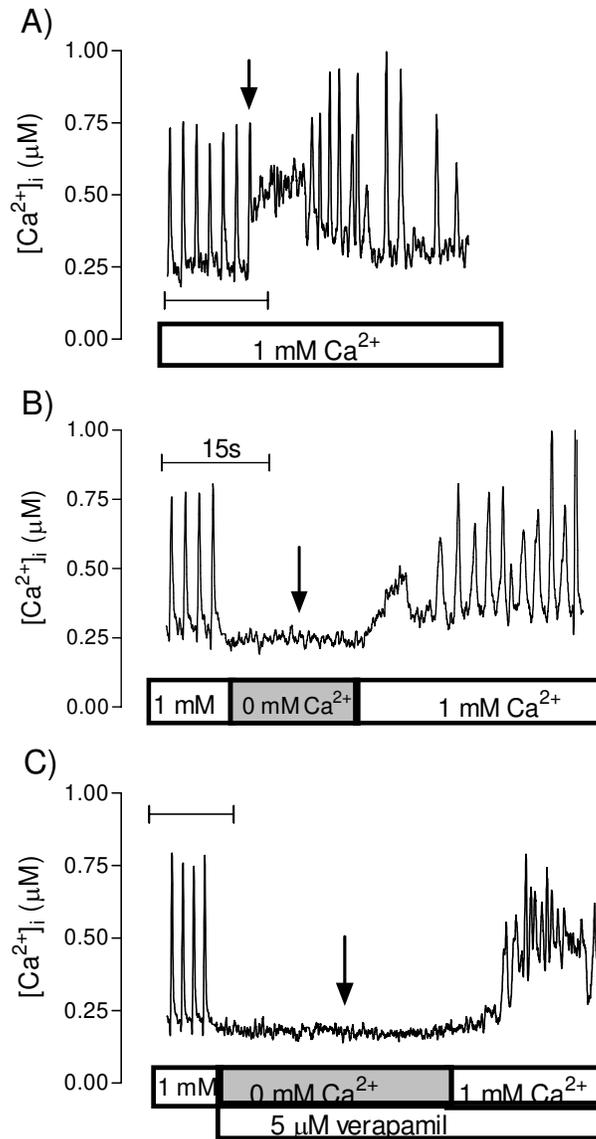


Figura 4.6: Traçados de $[Ca^{2+}]_i$ registrados durante estimulação elétrica. Um pulso de alta intensidade (12 X o limiar de estimulação, indicado pela seta) foi aplicado em três condições: na presença de Ca^{2+} externo (A), na ausência de Ca^{2+} externo (B) e na ausência de Ca^{2+} externo e presença de verapamil (C).

D) Papel do RS na sobrecarga citosólica de Ca^{2+} :

Para investigar se o RS tem algum papel na resposta contrátil e de $[Ca^{2+}]_i$ a choques de alta intensidade, realizamos alguns experimentos com células tratadas com TG, inibidor irreversível da ATPase de Ca^{2+} do RS. Observe-se que, neste caso, a célula foi estimulada a uma frequência menor (0,1 Hz) para permitir a restauração da $[Ca^{2+}]_i$.

diastólica após transientes evocados pela estimulação elétrica de baixa amplitude, dado que a inibição da captação de Ca^{2+} pelo RS prolonga acentuadamente a fase de queda do transiente.

Quando o pulso de alta intensidade (15x o limiar) foi aplicado antes do tratamento com TG (condição controle), ocorreu um aumento sustentado da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, oscilações de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e posterior recuperação (Figura 4.7-A). Após o tratamento com TG e depleção de Ca^{2+} do RS com cafeína, observamos que o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em resposta a um pulso da mesma intensidade não foi atenuado, mas, ao contrário, foi maior e de maior duração, e as oscilações pós-choque foram consideravelmente suprimidas (Figura 4.7-B). Além disso, o aumento da amplitude dos *twitches* após retorno da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica aos níveis pré-choque foi totalmente abolido.

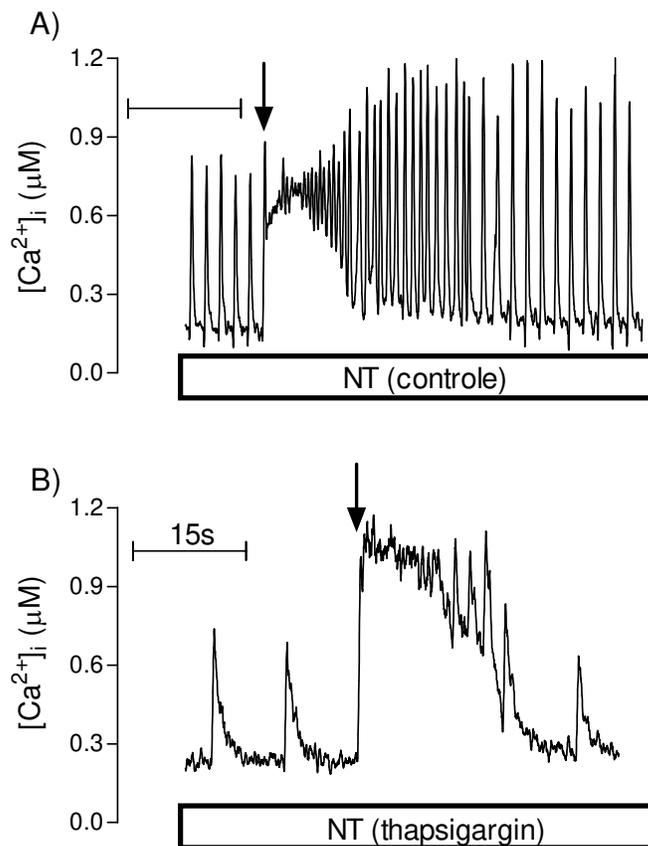


Figura 4.7: Traçados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ registrados durante estimulação. Um pulso de alta intensidade (15 vezes o limiar de estimulação, indicado pela seta) foi aplicado em duas condições: antes (A) e depois do tratamento com thapsigargin.

4.2 – DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO E LETALIDADE

A) Letalidade de campos elétricos em miócitos despolarizados

Os valores de 2a e 2c, apresentados na Tabela 4.1, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p > 0,05$, teste *t de Student*). Em 130 mM $[K^+]_o$, a célula se encontra inexcitável (V_m de repouso ~ 0), o que impossibilitou a determinação do limiar de estimulação. Os valores de EL50 e $V_{e-max}50$ estão na Tabela 4.2. Na Figura 4.8, estão apresentadas as curvas de letalidade em função da intensidade de **E** (painel A) e de V_{e-max} (painel B), determinadas na presença de 6 (grupo controle, N=12) e 130 mM $[K^+]_o$ (N=11), onde se pode ver um deslocamento para a direita de ambas as curvas obtidas em células despolarizadas. O desvio de $V_{e-max}50$ ficou entre 84 e 136 mV, que está razoavelmente próximo do valor de V_m de repouso (cerca de -85 mV, Bassani *et al.*, 2004). Não houve diferença entre os valores de *n* ($p > 0,05$, Tabela 4.2).

Tabela 4.1: Médias \pm erros-padrões das médias da largura (2a) e do comprimento (2c), determinados em células expostas a $[K^+]_o$ de 6 (N=12) e 130 mM (N=11).

	$[K^+]_o$	
	6mM	130mM
Largura (μm)	32,9 \pm 2,1	31,9 \pm 2,5
Comprimento (μm)	125,3 \pm 5,8	139,5 \pm 6,9

Tabela 4.2: Valores médios e intervalos de confiança para 95% (IC95%) do campo elétrico e máximo potencial extracelular associados com 50% de letalidade (EL50 e $V_{e-max}50$, respectivamente) e do coeficiente de Hill (*n*) das respectivas curvas, determinados em células expostas a $[K^+]_o$ de 6 (N=12) e 130 mM (N=11). * $p < 0,05$.

	$[K^+]_o$			
	6 mM		130 mM	
	média	IC95%	média	IC95%
EL50(V/cm)	71,0	68,1 a 74,0	87,5	77,9 a 98,1*
<i>n</i>	5,22	4,18 a 6,26	9,213	-0,05 a 18,48
$V_{e-max}50$ (mV)	456,5	444,3 a 469,0	567,2	553,8 a 581,0*
<i>n</i>	7,37	5,99 a 8,75	7,94	6,46 a 9,41

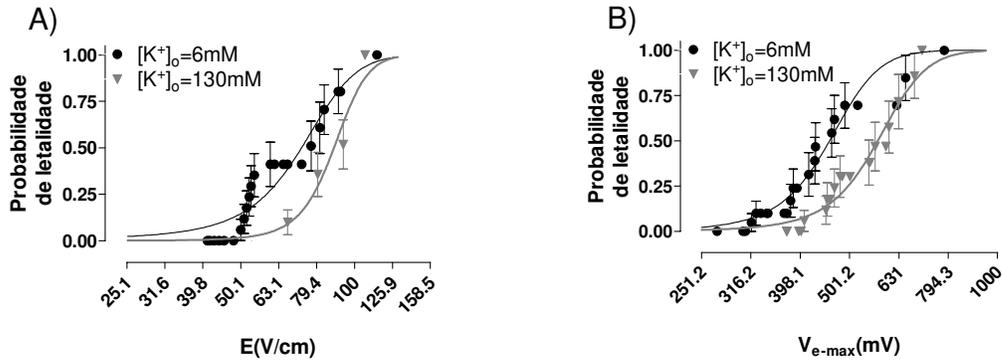


Figura 4.8: Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico (**E**) (painel A) e do máximo potencial extracelular (V_{e-max}) (painel B) em células expostas a $[K^+]_o$ de 6 (N=12) e 130 mM (N=11). As linhas verticais indicam os erros-padrões da média.

Em todas as células estimuladas na direção longitudinal com pulsos monopares letais, a contratura resultante inicia-se na extremidade da célula mais próxima do anodo. É interessante observar que este padrão se manteve mesmo na presença de 130 mM $[K^+]_o$.

B) Letalidade de campos elétricos durante inibição da captação mitocondrial de Ca^{2+}

Nestes experimentos, utilizou-se o FCCP, um fármaco que dissipa o gradiente de concentração de H^+ através da membrana mitocondrial interna, o qual é o principal componente da diferença de potencial elétrico através desta membrana e a força eletromotriz tanto para a síntese mitocondrial de ATP acoplada à fosforilação oxidativa, quanto para a captação de Ca^{2+} através do uniporter mitocondrial (Gunter et al., 1994). Por causa da depleção de ATP resultante do tratamento prolongado com FCCP (> 3 min), não foram determinadas curvas de letalidade, mas foram testadas apenas 3 amplitudes de estímulo (Figura 4.9), com aplicação de um único choque por célula. Campos de intensidade de $20x E_T$, que são letais a ~50% das células sob condições controle (Oliveira, 2004), foram letais a todas as 4 células testadas na presença de FCCP. Na presença de FCCP, a produção de lesão letal em 50% de células (3 em 6) foi observada para um estímulo de $16x E_T$, que, na condição controle, é letal a ~7,5% da população de células (Oliveira, 2004). Estimulação com intensidade equivalente a $12x E_T$, que é letal < 3% das células controles, resultou em letalidade de um terço das células (2 em 6) na presença de FCCP (Figura 4.9). Estes resultados mostram que a inibição metabólica torna os miócitos mais vulneráveis ao efeito letal do **E**. As dimensões das células do

grupo FCCP (largura = $34,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$ e comprimento = $128,6 \pm 10,2 \mu\text{m}$) não foram significativamente diferentes daquelas no grupo controle (largura = $32,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$ e comprimento = $125,3 \pm 5,8 \mu\text{m}$).

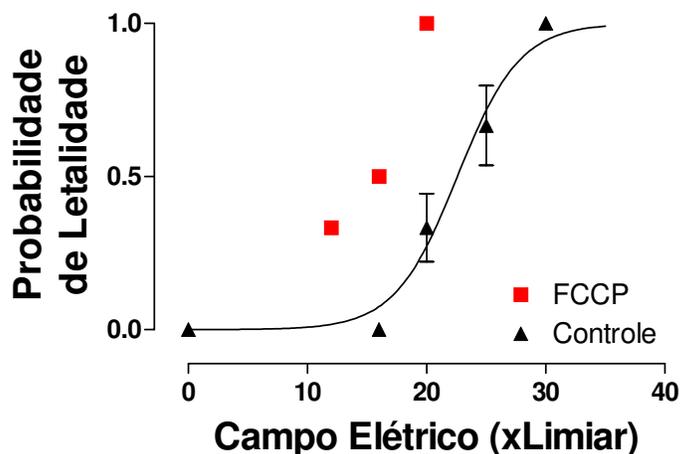


Figura 4.9: Curva de letalidade em função da intensidade do campo elétrico, expresso como um múltiplo do campo limiar (x campo limiar), em células controle e expostas a FCCP.

C) Letalidade de campos elétricos aplicados na forma de pulsos bipolares

Os valores de E_T e de ΔV_T , determinados com pulsos bipolares de baixa intensidade com duração de 10 ms no total dos dois semi-ciclos, não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$; análise de variância monofatorial; Tabela 4.3 e Figura 4.10) entre as populações de células às quais foram aplicados pulsos de alta intensidade (duração de 10 ms, $N=11$) e bipolares (duração de 10 e 20 ms, $N=9$ e 10 , respectivamente). Isto permite concluir que as células dos diferentes grupos responderam de modo semelhante à estimulação limiar. Os valores de $2a$ e de $2c$ também não foram diferentes ($p > 0,05$; análise de variância monofatorial; Tabela 4.3).

As curvas de letalidade determinadas com pulsos bipolares com duração total de 10 ms deslocaram-se para a direita, em comparação com o grupo no qual foram usados pulsos monopulares da mesma duração total (Tabela 4.4 e Figura 4.11). Ao aumentarmos a duração total do pulso bipolar para 20 ms, as curvas de letalidade sofreram deslocamento à esquerda (Tabela 4.4 e Figura 4.11). Observou-se também uma queda significativa de n no grupo bipolar (20 ms) apenas para a curva em função de E (Tabela 4.4 e Figura 4.11).

Tabela 4.3: Médias \pm erros-padrões das médias do campo limiar de estimulação (E_T), do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação (ΔV_T), da largura (2a) e do comprimento (2c) em células submetidas à estimulação de alta intensidade com pulsos mono (10 ms de duração, N=11) ou bipolares (10 e 20 ms de duração, N=9 e 10, respectivamente).

	Grupo		
	Monopolar	Bipolar (10ms)	Bipolar (20ms)
E_T (V/cm)	3,15 \pm 0,11	3,18 \pm 0,15	3,21 \pm 0,10
ΔV_T (mV)	23,21 \pm 0,75	23,97 \pm 0,95	23,05 \pm 0,44
Largura (μ m)	33,5 \pm 2,4	32,5 \pm 2,5	33,4 \pm 1,7
Comprimento (μ m)	137,0 \pm 3,0	142,1 \pm 7,1	133,4 \pm 3,6

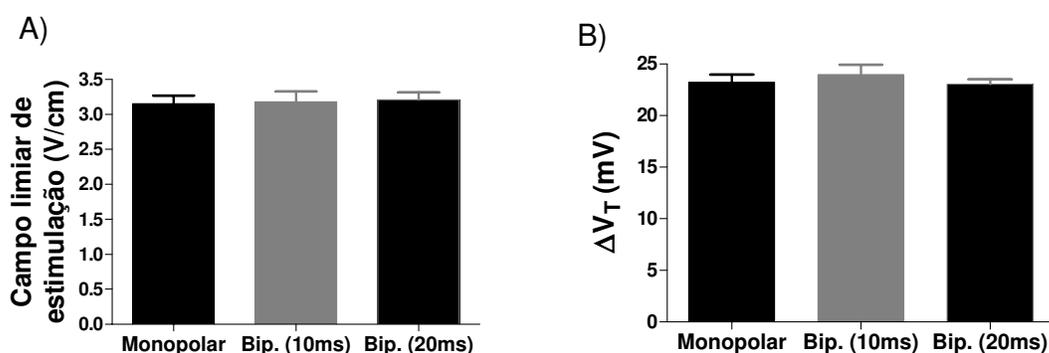


Figura 4.10: Médias (barras) e erros-padrões (linhas verticais) do campo limiar de estimulação (A) e do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação(B), em células submetidas à estimulação de alta intensidade com pulsos mono (N=11) ou bipolares (Bip., 10 ms, N=9; e 20 ms, N=10).

Tabela 4.4: Valores médios e intervalos de confiança para 95% (IC95%) do campo elétrico e máximo potencial extracelular associados com 50% de letalidade (EL_{50} e $V_{e-max50}$, respectivamente) e do coeficiente de Hill (n) das respectivas curvas, em células submetidas à estimulação de alta intensidade com pulsos mono (10 ms, N=11) ou bipolares (10 ms, N=9 e 20 ms, N=10). * $p < 0,05$ vs. monopolar; # $p < 0,05$ vs. bipolar (10 ms).

	Grupo					
	Monopolar		Bipolar (10 ms)		Bipolar (20ms)	
	média	IC95%	média	IC95%	média	IC95%
EL_{50} (V/cm)	69,6	68,9 a 70,4	81,9	81,4 a 82,5*	62,5	61,2 a 63,9*#
n	22,15	16,96 a 27,34	18,59	16,42 a 20,75	11,97	8,52 a 15,41*#
$V_{e-max50}$ (mV)	518,6	513,1 a 524,2	621,7	616,9 a 626,5*	442,5	438,7 a 446,3*#
n	14,35	12,19 a 16,52	16,12	14,01 a 18,23	14,42	12,70 a 16,15

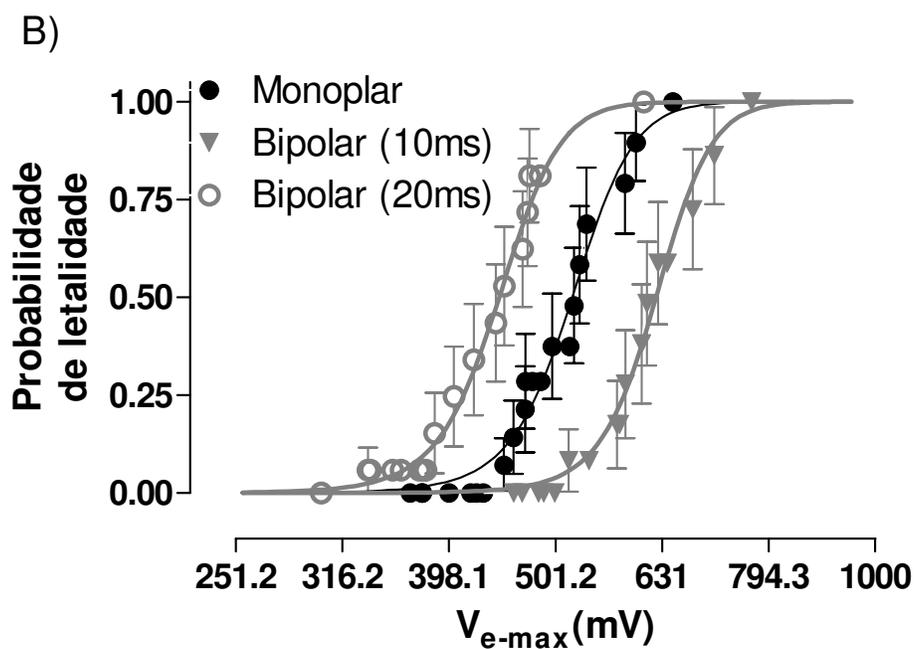
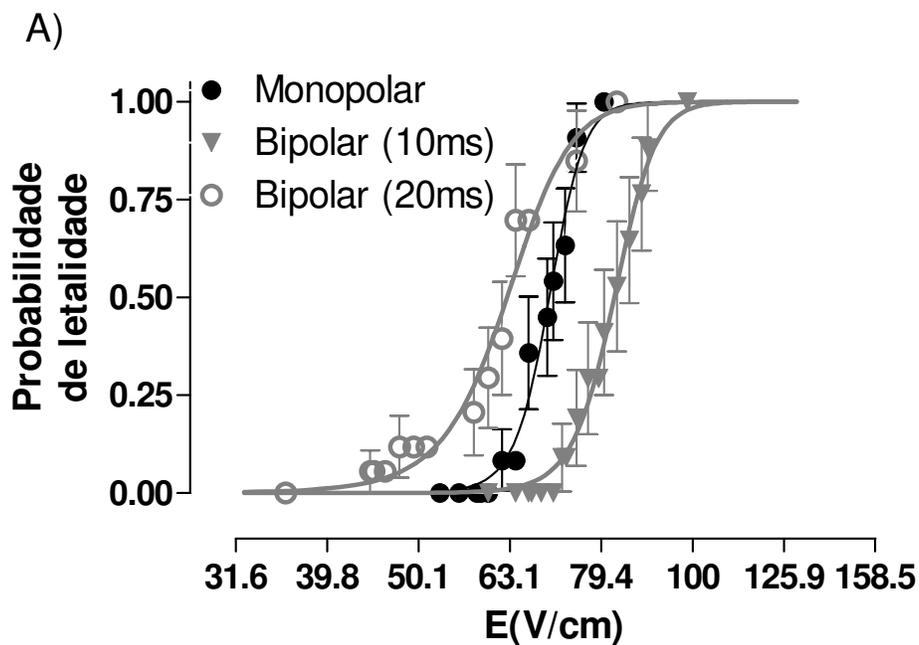


Figura 4.11: Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico (E) (painel A) e do máximo potencial extracelular (V_{e-max}) (painel B) em células submetidas à estimulação de alta intensidade com pulsos mono (10 ms, $N=11$) ou bipolares (10 ms, $N=9$; 20 ms, $N=10$). As linhas verticais indicam os erros-padrões da média.

A assimetria do início da contratatura evocada por pulsos monopolares de alta intensidade, iniciada na extremidade da célula voltada para o anodo, não ocorreu quando se usou pulsos bipolares.

D) Estimulação β -adrenérgica

Os valores de E_T , de ΔV_T e da amplitude de contração em resposta a estímulos de baixa intensidade foram determinados na ausência de ISO, em células posteriormente tratadas com o agonista (-ISO, N=9) e células que não foram expostas ao ISO (controle, N=12) e estão apresentados na Tabela 4.5 e na Figura 4.12. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). Os valores de largura e comprimento das células também não foram diferentes ($p>0,05$, teste t, Tabela 4.5). Estes resultados indicam que a população de células posteriormente expostas a ISO foi comparável com a de células controles na ausência do agonista.

A fim de estudar com maior detalhe o efeito do ISO sobre a resposta a estímulos de baixa intensidade, determinamos E_T , ΔV_T e a amplitude da contração na mesma população de células (N=9) antes (-ISO) e depois da aplicação de 10 nM ISO (+ISO). Podemos observar que E_T e ΔV_T foram menores na presença de ISO, e que a amplitude da contração a 0,5 Hz foi ~75% maior ($p<0,01$; teste t para amostras pareadas; Tabela 4.6), o que caracteriza o marcante efeito inotrópico positivo do agonista nesta concentração, bem como seu efeito redutor do limiar estimulatório .

Tabela 4.5: Médias \pm erros-padrões das médias do campo limiar de estimulação (E_T), do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação (ΔV_T), da largura e do comprimento obtidos na ausência de isoproterenol, em células não tratadas (controle, N=12) e células posteriormente expostas a 10 nM isoproterenol (-ISO, N=9).

	Grupo	
	Controle	-ISO
E_T (V/cm)	3,00 \pm 0,28	3,13 \pm 0,13
ΔV_T (mV)	20,24 \pm 1,74	23,16 \pm 0,93
Largura (μ m)	32,9 \pm 2,1	31,9 \pm 2,5
Comprimento (μ m)	125,3 \pm 5,8	139,5 \pm 6,9

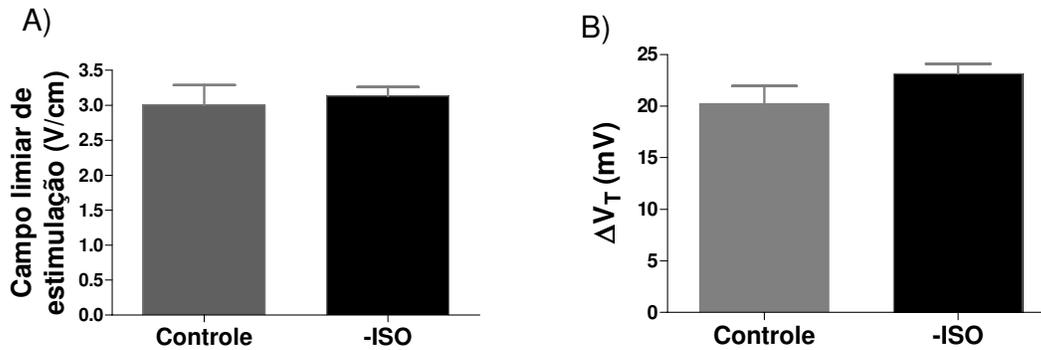


Figura 4.12: Médias (barras) e erros-padrões (linhas verticais) do campo limiar de estimulação (A) e do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação (B) obtidos na ausência de isoproterenol, em células não tratadas (controle, N=12) e células posteriormente expostas a 10 nM isoproterenol (-ISO, N=9).

Tabela 4.6: Médias \pm erros-padrões das médias do campo limiar de estimulação (E_T), do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação (ΔV_T), e da amplitude da contração (Δ contração), expressa como % do comprimento de repouso da célula (CRC) na ausência (-ISO) e na presença de 10 nM isoproterenol (+ISO). N= 9. ** $p < 0,01$.

	-ISO	+ ISO
E_T (V/cm)	$3,13 \pm 0,13$	$2,90 \pm 0,16^{**}$
ΔV_T (mV)	$23,16 \pm 0,93$	$21,47 \pm 1,08^{**}$
Δ contração (%CRC)	$5,86 \pm 0,90$	$10,36 \pm 1,47^{**}$

Na Figura 4.13, estão apresentadas as curvas de letalidade, em função de **E** (painel A) e de V_{e-max} (painel B), determinadas na ausência (controle, N= 12) e na presença (N= 9) de 10 nM ISO. Os valores de EL50, $V_{e-max}50$ e n estão na Tabela 4.7. Podemos observar que a estimulação β adrenérgica reduziu a sensibilidade dos miócitos ao efeito letal do campo elétrico, pois ambos EL50 e $V_{e-max}50$ foram maiores na presença de ISO ($p < 0,05$). Observou-se também um aumento significativo de n no grupo ISO.

Tabela 4.7: Valores médios e intervalos de confiança para 95% (IC95%) do campo elétrico e máximo potencial extracelular associados com 50% de letalidade (EL50 e $V_{e-max}50$, respectivamente) e do coeficiente de Hill (n) das curvas, na ausência (controle, N=12) e na presença de 10 nM isoproterenol (ISO, N= 9). * $p < 0,05$.

	Grupo			
	Controle		10 nM ISO	
	média	IC95%	média	IC95%
EL50(V/cm)	71,0	68,1 a 74,0	82,0	80,9 a 83,2*
n	5,22	4,18 a 6,26	18,38	14,14 a 22,63*
$V_{e-max}50$ (mV)	456,5	444,3 a 469,0	635,4	625,5 a 645,4*
n	7,37	5,99 a 8,75	11,19	9,244 a 13,13*

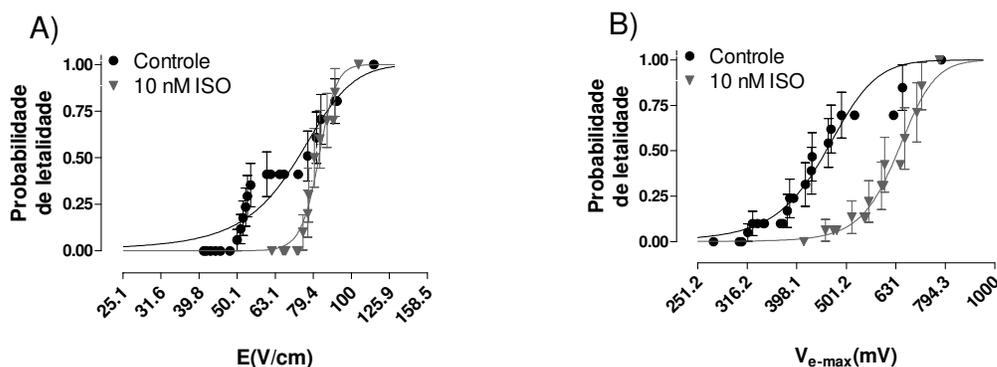


Figura 4.13 Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico (**E**) (painel A) e do máximo potencial extracelular (V_{e-max}) (painel B), na ausência (controle, N=12) e na presença de 10 nM isoproterenol (ISO, N= 9). As linhas verticais indicam os erros-padrões da média.

A estimulação β -adrenérgica resulta em aumento da mobilização de Ca^{2+} em miócitos cardíacos (e.g., Bers, 2001; Soriano *et al.*, 2007). Para testar a hipótese de que este efeito pudesse estar envolvido no efeito protetor do ISO, impedimos o aumento da mobilização de Ca^{2+} do citosol pela aplicação do agonista na ausência de Ca^{2+} extracelular e de estimulação elétrica, após depleção do estoque de Ca^{2+} do RS. As células do grupo controle deste protocolo (grupo $0Ca^{2+}$, N=9) não sofreram tratamento farmacológico. No grupo $0Ca^{2+}$ +ISO (N=7), o protocolo foi semelhante, exceto pela adição de ISO. As dimensões das células do grupo $0Ca^{2+}$ ($2a = 34,6 \pm 2,4 \mu m$ e $2c = 128,8 \pm 3,7 \mu m$) não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) daquelas no grupo $0Ca^{2+}$ +ISO ($2a = 35,94 \pm 2,59 \mu m$ e $2c = 125,8 \pm 4,17 \mu m$). Os valores de EL50 e $V_{e-max}50$ estão na Tabela

4.8. Na Figura 4.14, estão apresentadas as curvas de letalidade em função da intensidade de **E** (painel A) e de V_{e-max} (painel B). As células do grupo $0Ca^{2+}$ foram menos sensíveis ao efeito letal de **E** (aumento de 11% em EL50, $p < 0.5$) e de V_{e-max} , em comparação com o grupo controle do protocolo, no qual o choque foi aplicado na presença de Ca^{2+} (Tabelas 4.7 e 4.8). Porém, esta redução de sensibilidade pela inibição da mobilização de Ca^{2+} não ocorreu em células tratadas com ISO, de modo que, com o protocolo $0Ca^{2+}$, o efeito protetor exercido pelo ISO foi abolido (Tabela 4.8 e Figura 4.14).

Tabela 4.8: Valores médios e intervalos de confiança para 95% (IC95%) do campo elétrico e máximo potencial extracelular associados com 50% de letalidade (EL50 e $V_{e-max50}$, respectivamente) e do coeficiente de Hill (n) das respectivas curvas, na ausência de Ca^{2+} extracelular, em miócitos não tratados (controle, $0Ca^{2+}$, N=9) e expostos a 10 nM isoproterenol ($0Ca^{2+}$ + ISO, N= 7).

	Grupo			
	$0 Ca^{2+}$		$0 Ca^{2+} + ISO$	
	média	IC95%	média	IC95%
EL50(V/cm)	78,5	77,4 a 79, 6	79,0	77,7 a 84,3
n	17,22	12,52 a 21,92	10,04	6,26 a 17,43
$V_{e-max50}$ (mV)	553,2	543,7 a 562,8	536,4	546,0 a 564,2
n	12,95	9,96 a 15,92	10,24	9,18 a 13,06

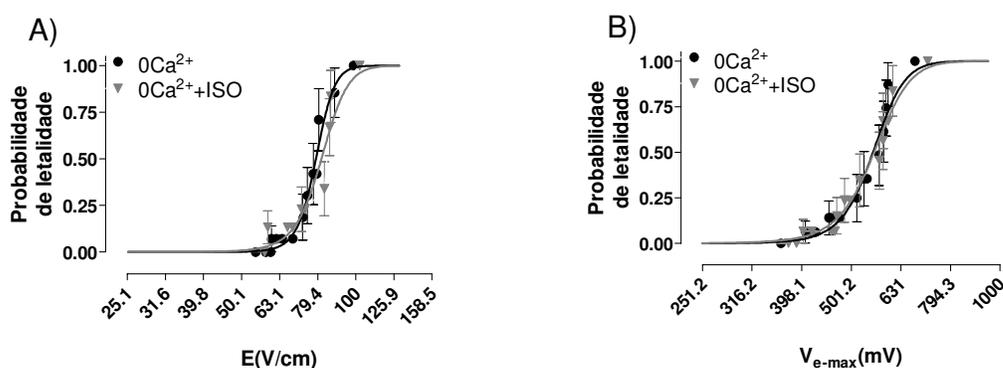


Figura 4.14. Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico (**E**) (painel A) e do máximo potencial extracelular (V_{e-max}) (painel B), na ausência de Ca^{2+} extracelular em miócitos não tratados (controle, $0Ca^{2+}$, N=9) e expostos a 10 nM isoproterenol ($0Ca^{2+}$ + ISO, N= 7). As linhas verticais indicam os erros-padrões da média.

E) Letalidade de campos elétricos após indução de *stress*

Os valores de E_T e ΔV_T , bem como as dimensões celulares, determinados em células de animais não manipulados (grupo controle, N=12), imobilizados (grupo imobilização, N=10) e expostos a choques nas patas (grupo choque, N=11) estão apresentados na Tabela 4.9 e na Figura 4.15. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$; análise de variância monofatorial).

Tabela 4.9: Médias \pm erros-padrões das médias do campo limiar de estimulação (E_T), do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação (ΔV_T), da largura (2a) e do comprimento (2c), em células de animais não manipulados (grupo controle, N=12), imobilizados (grupo imobilização, N=10) e tratados com choques nas patas (grupo choque, N=11).

	Grupo		
	Controle	Imobilização	Choque
E_T (V/cm)	$3,00 \pm 0,28$	$2,78 \pm 0,17$	$3,24 \pm 0,17$
ΔV_T (mV)	$20,24 \pm 1,74$	$19,80 \pm 1,01$	$20,84 \pm 0,28$
Largura (um)	$32,9 \pm 2,1$	$29,4 \pm 2,6$	$33,0 \pm 1,9$
Comprimento (um)	$125,3 \pm 5,8$	$134,3 \pm 2,9$	$120,0 \pm 7,0$

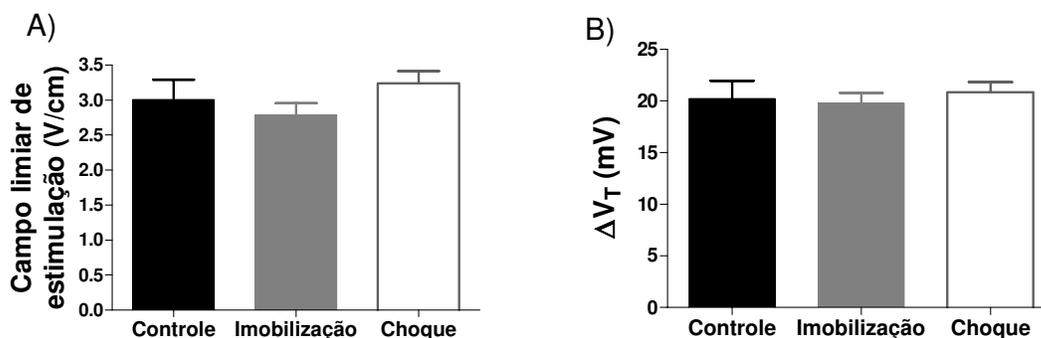


Figura 4.15: Médias (barras) e erros-padrões (linhas verticais) do campo limiar de estimulação (A) e do máximo potencial extracelular no limiar de estimulação(B), em células de animais não manipulados (grupo controle, N=12), imobilizados (grupo imobilização, N=10) e tratados com choques nas patas (grupo choque, N=11).

As curvas de letalidade determinadas em miócitos de ratos nos quais foi induzido *stress*, independente do modo de indução (imobilização ou choque), deslocaram-se para a direita, em comparação com o grupo controle. Isto indica que a indução repetida de *stress* reduz a sensibilidade das células ao efeito letal de campos de alta intensidade. Observou-se também um aumento significativo de *n* nos grupos Imobilização e Choque (Tabela 4.10 e Figura 4.16).

Tabela 4.10: Valores médios e intervalos de confiança para 95% (IC95%) do campo elétrico e máximo potencial extracelular associados com 50% de letalidade (EL50 e $V_{e-max50}$, respectivamente) e do coeficiente de Hill (*n*) das respectivas curvas, em células de animais não manipulados (grupo controle, N=12), imobilizados (grupo imobilização, N=10) e tratados com choques nas patas (grupo choque, N=11). * $p < 0,05$ vs. Controle; # $p < 0,05$ vs. Imobilização.

	Grupo					
	Controle		Imobilização		Choque	
	média	IC95%	média	IC95%	média	IC95%
EL50(V/cm)	71,0	68,1 a 74,0	80,5	78,5 a 82,5*	77,7	76,0 a 79,5*
<i>n</i>	5,22	4,18 a 6,26	12,92	8,994 a 16,85*	9,34	7,484 a 11,19*
$V_{e-max50}$ (mV)	456,5	444,3 a 469,0	567,8	560,7 a 574,9*	488,9	483,4 a 494,4*#
<i>n</i>	7,37	5,99 a 8,75	12,11	10,23 a 14,00*	13,28	11,36 a 15,21*

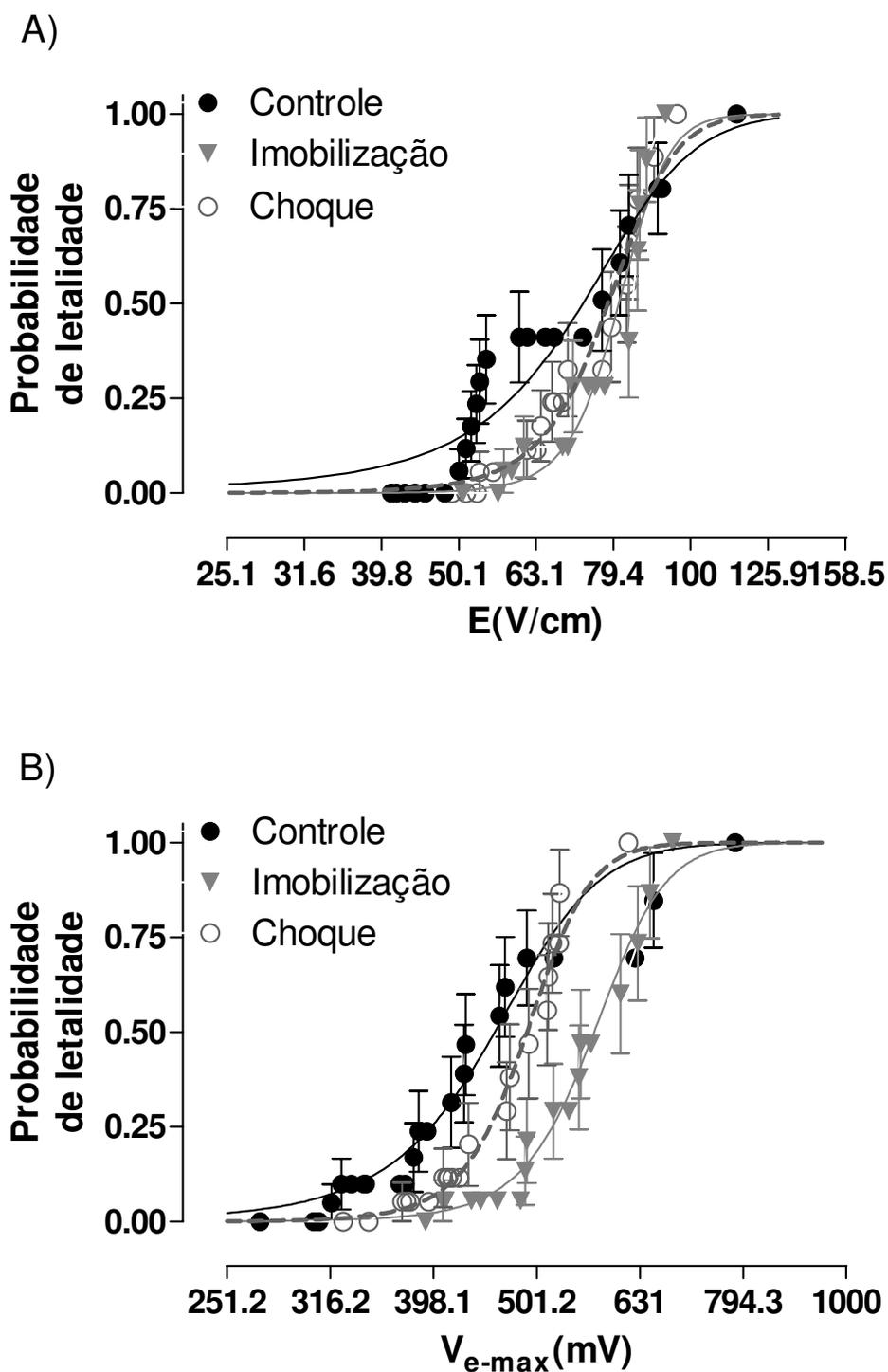


Figura 4.16: Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico (E) (painel A) e do máximo potencial extracelular (V_{e-max}) (painel B) em células de animais não manipulados (grupo controle, $N=12$), imobilizados (grupo imobilização, $N=10$) e tratados com choques nas patas (grupo choque, $N=11$). As linhas verticais indicam os erros-padrões da média.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Embora existam trabalhos na literatura (*e.g.*, Knisley & Grant, 1995) que apresentem valores de **E** letais em miócitos cardíacos, não havia relato de como a intensidade de **E** se relaciona à produção de lesão, ou sido proposta uma abordagem metodológica para responder esta questão. Utilizamos um método, desenvolvido em nosso laboratório (Oliveira, 2004), que nos permitiu uma análise quantitativa e probabilística da relação entre a intensidade do **E** aplicado a miócitos cardíacos isolados e letalidade. Esta análise permitiu a obtenção de um parâmetro que descreve a sensibilidade da preparação a **E**, e foi utilizada não somente para investigar os mecanismos envolvidos na lesão celular por **E** de alta intensidade, mas também para testar condições que pudessem exercer efeito protetor sobre a célula exposta a **E** de alta intensidade.

5.1 – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DEPRESSÃO CONTRÁTIL E MORTE CELULAR

A sobrecarga de Ca^{2+} acompanhada de contratura foi observada em células submetidas a **E** letais (Figura 4.2) e subletais (Figura 4.1) de alta intensidade. No caso de **E** subletais, ocorreram oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ durante e após a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ diastólica que foi acompanhada por contratura. Observou-se ainda aumento da amplitude das contrações e dos transientes de Ca^{2+} evocados por estímulos de baixa intensidade (efeito inotrópico positivo) após o retorno de $[Ca^{2+}]_i$ diastólica para valores pré-choque. Este tipo de resposta contrátil foi também observado em preparações multicelulares de átrio esquerdo isolado de rato (Soares, 2003; Moura *et al.*, 2004). O efeito inotrópico positivo pode ser o resultado de um aumento da carga de Ca^{2+} do RS devido à grande elevação de $[Ca^{2+}]_i$ logo após aplicação do estímulo de alta intensidade, o que pode aumentar a eficiência do AEC (Han *et al.*, 1994; Bassani *et al.*, 1995b; Shannon, 2000). A ausência deste efeito inotrópico positivo após inibição irreversível da ATPase de Ca^{2+} do RS com TG (Bassani *et al.*, 1993) seguida de depleção do estoque de Ca^{2+} da organela (Figura 4.7B) está de acordo com esta hipótese.

Uma observação interessante é que, para choques subletais, a elevação diastólica de $[Ca^{2+}]_i$ é transitória, com o retorno para os níveis pré-choque após 10-20 s. O caráter transitório desta resposta permanece após inibição irreversível da ATPase de $[Ca^{2+}]_i$ do RS, o que sugere que a recuperação da $[Ca^{2+}]_i$ possa refletir a remoção de uma via de influxo (*e.g.*, possivelmente o fechamento de eletroporos). Isto permitiria que mecanismos de remoção de Ca^{2+} citosólico pudessem restaurar $[Ca^{2+}]_i$ diastólica para os valores pré-choque. Por outro lado, a inibição da captação de Ca^{2+} pelo RS resultou em elevação maior e mais duradoura da $[Ca^{2+}]_i$ diastólica. Isto sugere um papel do RS no amortecimento da sobrecarga de Ca^{2+} , provavelmente pelo seqüestro do Ca^{2+} que adentra a célula após o choque pela ATPase de Ca^{2+} do RS, cuja velocidade de transporte aumentaria com o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ (Bers, 2001). Também foi observada, após inibição da função do RS, a supressão das oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta à aplicação do pulso de alta intensidade (Figura 4.7). Interpretamos estes resultados propondo que essas oscilações seriam causadas pela liberação espontânea de Ca^{2+} via canais de liberação de Ca^{2+} do RS, os quais têm sua atividade aumentada com o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e da carga de Ca^{2+} do RS (Fabiato, 1983; Bassani *et al.*, 1995b,1997; Lukyanenko *et al.*, 2001; Shannon *et al.*, 2000, 2002). Assim, concluímos que o RS não contribui para a sobrecarga de Ca^{2+} : pelo contrário, tende a diminuí-la; porém, contribui para o efeito inotrópico positivo observado após estimulação de alta intensidade (Figura 4.1). Portanto, pode ocorrer uma menor tolerância ao choque desfibrilatório em situações nas quais a função do RS está deprimida, como a insuficiência cardíaca (Piacentino *et al.*, 2003) e/ou quando a liberação de Ca^{2+} do RS é supranormal, como durante estimulação adrenérgica prolongada e ativação persistente da PKA e da quinase de proteínas dependente do complexo Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII), presente durante a sobrecarga de pressão arterial e insuficiência cardíaca (Marx *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Ai *et al.*, 2005; Curran *et al.*, 2007). Nestas condições, a sobrecarga de Ca^{2+} poderia ser maior e/ou haveria maior facilitação da geração de atividade espontânea, levando ao aparecimento de arritmias e até à morte celular (Bassani *et al.*, 1997; Bers, 2001; Berridge, 1998; Bassani & Bassani, 2003b; Maier *et al.*, 2003; Kohlhaas *et al.*, 2006).

O aumento de $[Ca^{2+}]_i$ evocado por estímulo de alta intensidade depende da presença de concentrações milimolares de Ca^{2+} no meio externo (Knisley & Grant, 1995; Figuras 4.3 e 4.4). Observe-se que a solução Tyr-0Ca não é totalmente livre de Ca^{2+} . A presença de 1 mM EGTA reduz a $[Ca^{2+}]_o$ contaminante de ~10 para ~1 μ M. Ao trabalhar com a solução Tyr-0Ca, tomamos cuidado para minimizar a alteração da distribuição de

cargas elétricas na face externa da membrana com a substituição equimolar do Ca^{2+} da solução por outro cátion divalente (Mg^{2+}). Como a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólica em miócitos ventriculares isolados de rato é cerca de $0,20 \mu\text{M}$ (Bassani & Bassani, 2002; Ricardo *et al.*, 2008), a diferença de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ extra e intracelular, mesmo na presença de EGTA, seria suficiente para permitir algum influxo do íon pelos eletroporos. Entretanto, sinais de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (contrações espontâneas) foram observados apenas quando $[\text{Ca}^{2+}]_o$ foi $\geq 0,1 \text{ mM}$.

Quando $[\text{Ca}^{2+}]_o$ foi rapidamente retornada a 1 mM (tipicamente 10-15 s após o choque), desenvolveu-se acúmulo de Ca^{2+} citosólico e contrações espontâneas no caso de estímulos subletais (Figura 6.14), porém de modo aparentemente menos severo do que na condição controle. No entanto, a perfusão com solução Tyr-0Ca durante o choque não impediu a morte celular após reintrodução do Ca^{2+} externo no caso de choques de intensidades mais altas. Estes resultados estão de acordo com os observados por Knisley & Grant (1995), que relataram que a lesão irreversível de miócitos isolados submetidos a campos elétricos de alta intensidade (100 a 150 V/cm) é dependente da presença de Ca^{2+} externo. Resultados similares foram observados no presente estudo quando os miócitos foram perfundidos com a solução sem Ca^{2+} por até 5 minutos após aplicação do pulso de alta intensidade (resultado não mostrado) e em preparações multicelulares submetidas a um protocolo experimental semelhante (Soares, 2003). Além disso, a ausência de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em resposta ao choque em meio sem Ca^{2+} , mesmo no caso de campos letais, indica que o acúmulo de Ca^{2+} não se deve à liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, como o RS e as mitocôndrias. Jones *et al.* (1980), utilizando microscopia eletrônica, encontraram danos estruturais em mitocôndrias, RS e miofibrilas em miócitos submetidos a campo de 200 V/cm. No entanto, esta intensidade é bem superior à faixa de **E** utilizada no presente estudo, a qual é compatível com os valores de **E** experimentados pelo coração durante a desfibrilação (Yabe *et al.*, 1990).

No conjunto, nossas observações confirmam que o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é dependente da entrada de Ca^{2+} externo e que a via de entrada de Ca^{2+} permanece ativa por até vários minutos após aplicação do pulso de alta intensidade.

Uma possível via de entrada de Ca^{2+} é representada pelos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L presentes no sarcolema. No entanto, esta via foi descartada após experimentos nos quais a preparação foi exposta a verapamil, um bloqueador seletivo desses canais (Tsien *et al.*, 1991), desde antes da aplicação do choque (em meio sem Ca^{2+}) até os primeiros minutos após o retorno da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ a 1 mM

(Figura 4.6). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Tovar & Tung (1992) que observaram que, a partir de uma V_m de 0,4 V, o aumento de condutância da membrana de miócitos cardíacos de rã ocorre mesmo na presença de bloqueadores desse tipo de canal (1 mM Cd^{2+} e 1 mM Ni^{2+}).

Outra possível via é o NCX. Um possível alto influxo de Na^+ durante o choque poderia levar a acumulação citosólica deste íon, tornando assim mais negativo o potencial de reversão da troca, o que favoreceria o funcionamento do NCX no modo reverso (extruindo Na^+ e transportando Ca^{2+} para dentro da célula) após a readmissão de Ca^{2+} ao meio. Para testar esta possibilidade, retiramos ambos os íons da solução de perfusão (Figura 4.5) durante a aplicação do choque, para evitar que a concentração intracelular de Na^+ aumentasse após o estímulo. Podemos observar que, do mesmo modo que nos experimentos realizados na presença de Na^+ (Figura 4.4), ocorreram aumento diastólico e oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ após retorno à $[Ca^{2+}]_o$ controle. Assim, não nos parece que a NCX seja a principal via de entrada de Ca^{2+} que causa a sobrecarga após aplicação do estímulo de alta intensidade.

Com base nos resultados discutidos acima, consideramos como mais plausível a proposta de que a entrada de Ca^{2+} se faça por poros hidrofílicos formados na membrana devido à aplicação do estímulo de alta intensidade (eletroporação). Entretanto, ainda não podemos afirmar que a sobrecarga de Ca^{2+} se deva somente ao influxo de Ca^{2+} através dos poros. Não se pode descartar uma contribuição das vias mediadas por proteínas de sarcolema (canais de Ca^{2+} e NCX); porém, os presentes resultados indicam que esta contribuição, se existe, é pequena.

Em resumo, nossos resultados são consistentes com a hipótese de depressão contrátil e/ou morte celular causada pela sobrecarga de Ca^{2+} , devido ao influxo de Ca^{2+} principalmente através de poros não seletivos da membrana resultantes de eletroporação. No caso de choque subletais, a acumulação de Ca^{2+} no citosol parece ser amortecida pela captação de Ca^{2+} pelo RS, o que leva ao aumento do conteúdo de Ca^{2+} na organela, favorecendo maior liberação de Ca^{2+} espontânea nos primeiros segundos pós choque (oscilações de $[Ca^{2+}]_i$) e, posteriormente, um aumento da amplitude dos transientes de Ca^{2+} evocados pela estimulação de baixa intensidade. Se por um lado, as oscilações de $[Ca^{2+}]_i$ podem dar origem a arritmias pela geração de correntes despolarizantes (Schlotthauer & Bers, 2000; Bassani & Bassani, 2003b), por outro, o efeito inotrópico positivo que se instala após normalização de $[Ca^{2+}]_i$ pode contribuir para melhorar os parâmetros hemodinâmicos pós-desfibrilação.

5.2 – DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO E LETALIDADE

O V_e gerado por E induz um rearranjo de cargas em ambas as faces da membrana celular, causando uma variação de V_m , que é positiva do lado do catodo e negativa do lado do anodo, e se sobrepõe ao V_m de repouso. Uma vez que o fenômeno da eletroporação depende de V_m absoluto atingido (Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; DeBruin & Krassowska, 1999), espera-se que a anulação do V_m de repouso resultaria em menor sensibilidade ao efeito letal de E , já que um maior valor de V_e (e, portanto, de E) seria necessário para que a extremidade anódica da membrana fosse exposta ao V_m de repouso crítico para eletroporação. Nossos resultados experimentais confirmaram esta predição. As células despolarizadas por aumento de $[K^+]_o$ foram mais resistentes ao campo (Tabela 4.2 e Figura 4.8), pois os valores de EL50 e $V_{e-max}50$ foram cerca de 25% maiores do que em células polarizadas, com desvio paralelo das curvas para a direita. Além disso, em miócitos despolarizados, $V_{e-max}50$ foi aumentado em ~ 100 mV, um valor próximo do V_m de repouso de miócitos ventriculares de rato submetidos a condições experimentais semelhantes (-80 a -85 mV, Bassani *et al.*, 2004), o qual teria sido suprimido pela alta $[K^+]_o$. Uma importante conclusão é que, embora se espere que a eletroporação gere uma via de curto-circuito na membrana, limitando sua polarização, este resultado nos indica que os valores estimados de V_{e-max} (pelo menos até o nível de $V_{e-max}50$) representam uma aproximação razoável de ΔV_{max} .

Apesar da variação de V_m induzida por V_e ser igual em módulo nos dois lados da célula, como o V_m de repouso é negativo (-80 a -85 mV, Bassani *et al.*, 2004), ocorre uma assimetria de V_m final, ou seja, o valor em módulo de V_m é maior do lado do anodo: como a variação de V_m é negativa neste lado, ela se soma ao V_m de repouso, enquanto que, do lado do catodo, ocorre a subtração do V_m de repouso. Esta assimetria de polarização deve ser abolida com o aumento de $[K^+]_o$, ou seja, nesta condição, o V_m final durante o choque deve ser o mesmo em módulo nos dois lados da célula. Porém, mesmo na presença de alta $[K^+]_o$, a contratatura desenvolvida em resposta a E letal se manteve assimétrica, ou seja, iniciou-se sempre na extremidade da célula voltada para o anodo, tal como acontecia em células normalmente polarizadas. Este resultado (início de contratatura ou aumento de $[Ca^{2+}]_i$) também foi observado por outros pesquisadores que aplicaram pulsos de alta intensidade em células despolarizadas, isto é, durante o platô do potencial de ação ou na presença de alta $[K^+]_o$ (Knisley & Grant, 1995; Teruel & Meyer, 1997). No

entanto, observamos, assim como Tekle *et al.* (1990) haviam visto em células não excitáveis, que esta aparente assimetria de eletroporação foi abolida quando a célula foi estimulada por pulsos bipolares. Portanto, nossos resultados confirmam a proposta de que essa assimetria não é causada pela existência do V_m de repouso negativo, mas está relacionada a outros fatores, como possivelmente a assimetria de cargas das cabeças polares dos fosfolípidos presentes na membrana celular (Post *et al.*, 1988; Teruel & Meyer, 1997; Vernier *et al.*, 2006).

Foi observado que, após desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, as células ficaram menos resistentes a **E** (Figura 4.9). Com a perda do potencial elétrico através da membrana mitocondrial interna devida à ação do FCCP, ocorre anulação da força eletromotriz para a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias (Günter *et al.*, 1994), a qual poderia contribuir para amortecer a elevação de $[Ca^{2+}]_i$ resultante do choque. Portanto, é concebível que o desacoplamento possa exacerbar a sobrecarga de Ca^{2+} e aumentar a vulnerabilidade dos miócitos a **E**. Por outro lado, o processo de reparo da membrana, que provavelmente influencia na susceptibilidade das células a **E**, pode ser afetado negativamente pela queda da concentração intracelular de ATP durante a inibição metabólica (Li *et al.*, 1989), já que a remoção do gradiente de $[H^+]$ através da membrana mitocondrial interna interrompe a síntese do nucleotídeo. O ATP é necessário ao processo de reparo rápido da membrana celular (Haest *et al.*, 1997) e provavelmente também ao processo de reparo lento, pois este é semelhante à excitose dependente de ATP em células secretoras, conforme observado por Shimono *et al.* (2005) em células pancreáticas de rato. É importante notar, no entanto, que a curta exposição a FCCP nos presentes experimentos (< 3 min) provavelmente não foi suficiente para causar depleção marcante dos estoques celulares de ATP (Li *et al.*, 1989). Contudo, não podemos descartar depleção localizada no compartimento associado à região *trans* do sistema de Golgi, de onde provêm as vesículas que formam o *patch* de reparo (McNeil & Steinhardt, 2003). É importante lembrar que o coração em fibrilação perde sua função bombeadora, o que prejudica o aporte de O_2 e nutrientes também para o próprio miocárdio, o que leva a isquemia e pode comprometer a produção de ATP. Deste modo, podemos intuir que quanto mais longo o período de fibrilação, mais vulnerável o miocárdio se tornaria aos efeitos deletérios do choque. Isto pode contribuir para a queda da probabilidade de sucesso da desfibrilação com o tempo de arritmia. Estudos clínicos relatam que a probabilidade de óbito é de 50% se a arritmia é tratada nos primeiros 5 min, e aumenta

10% a cada minuto sem tratamento. Poucas tentativas de desfibrilação têm êxito após 10 minutos (Eisenberg *et al.*, 1980; Larsen *et al.*, 1993).

Buscando contribuir para o desenvolvimento de protocolos estimulatórios mais seguros, testamos a influência da forma de onda do choque sobre a sensibilidade dos miócitos ao efeito letal de **E**. A excitação de miócitos ventriculares com a forma de onda bipolar requer menor **E** e variação de V_m , quando comparada com a monopolar (Bassani *et al.*, 2006). Além disso, a forma bipolar em choques do tipo desfibrilatório é mais efetiva e causa menos efeitos deletérios (Faddy *et al.*, 2003). Os presentes resultados demonstram, pela primeira vez, que os melhores resultados obtidos *in vivo* com pulsos bipolares durante a desfibrilação poderiam ser atribuídos, pelo menos em parte, ao a um menor efeito lesivo sobre o miocárdio, inerente a esta forma de onda. Observamos que, para pulsos com a mesma duração total (10 ms), as células foram menos sensíveis à ação letal de **E** com pulsos bipolares do que com monopulares (Tabela 4.4 e Figura 4.11). Por exemplo, para um **E** de 70 V/cm (equivalente a $V_{e-max} \sim 500$ mV), a probabilidade de letalidade foi >50% para o pulso monopolar e ~0% para o pulso bipolar. Ainda não está claro porque o estímulo bipolar causa menos danos à célula. Vernier *et al.* (2006) propuseram que **E** de alta intensidade, além de produzir eletroporação, atua induzindo a externalização, na extremidade anódica da célula, de fosfolípidos carregados negativamente, os quais estão localizados preferencialmente no folheto interno da membrana. Esta alteração facilita a transição dos poros da configuração hidrofóbica para a hidrofílica, além de contribuir para a estabilização dos poros formados. Este fenômeno se mostrou cumulativo e dependente do tempo de aplicação do **E** (Vernier *et al.*, 2006). Assim, com a inversão de polaridade do pulso, o processo de expansão e/ou estabilização dos poros numa dada extremidade da membrana poderia ser interrompido, de modo que o grau de eletroporação seria menos severo do que com pulsos monopulares.

Quando aumentamos a duração dos pulsos bipolares (total de 20 ms), as curvas de letalidade se inverteram, ou seja, as células foram mais sensíveis à ação deletéria de **E** do que com monopulares de 10 s de duração (Tabela 4.4 e Figura 4.11). Este resultado não está de acordo com o resultado apresentado por Tovar e Tung (1992), que não observaram diferenças entre estímulos monopolar (10 ms) e bipolar (20 ms de duração total) no V_m requerido para eletroporação de miócitos ventriculares de anfíbios sob *voltage-clamp*, mas observaram que a reversão do aumento de condutância era mais rápida com pulsos bifásicos. Porém, a técnica utilizada para indução dos poros foi

diferente da que foi utilizada neste trabalho: enquanto esses autores utilizaram *voltage-clamp* (i.e., variação de tensão homogênea em toda a membrana), nós utilizamos, assim como nos processos clínicos de estimulação cardíaca, campos elétricos externos, que causam variações de V_m que são altamente variáveis no espaço. Além disso, nós não mensuramos a eletroporação, mas sim a probabilidade de letalidade, a qual envolve outros fenômenos, além da eletroporação.

Comparando os efeitos de ambas as configurações de pulsos bipolares, observamos que, para um dado valor de E , o pulso com duração total de 10 ms foi menos letal do que aquele com duração total de 20 ms. Isto poderia ser explicado pela relação positiva entre a duração do pulso e a densidade de poros e o tempo em que a célula permanece permeabilizada (Rols & Teissié, 1998; Gabriel & Teissié, 1999). O coeficiente de Hill da curva de letalidade vs. E para do grupo bipolar (duração de 20 ms) foi significativamente menor do que nos dois outros grupos (Tabela 4.4), no entanto não temos informação suficiente para propor uma explicação para este fenômeno.

Por outro lado, o pulso bipolar de amplitude alta o suficiente para produzir lesão irreversível provavelmente causa danos severos à membrana de ambas as extremidades da célula (anódica e catódica), pois a contratatura sustentada foi iniciada em ambos os lados da célula, diferentemente da contratatura observada em resposta ao estímulo letal monopolar, que foi iniciada somente na extremidade voltada para o anodo.

Um importante parâmetro a ser observado durante a estimulação por E é o fator de segurança (razão entre os valores de E requeridos para a lesão e excitação), que pode ser aproximado por $EL50/E_T$. É interessante notar que, em comparação com pulsos monopolares da mesma duração, o valor de E_T é ~25% menor para os pulsos bipolares (Bassani *et al.*, 2006), enquanto que $EL50$ é ~15% maior (presentes resultados), o que resulta em um fator de segurança 55% maior. Portanto, de acordo com nossos dados, pode-se concluir que a forma de onda bipolar seja superior à monopolar para desfibrilação e estimulação marca-passo, pois é mais eficiente na excitação elétrica, além de ser menos lesiva às células.

Espera-se que, na maioria dos casos em que a desfibrilação é necessária, ocorra um aumento do grau de estimulação β -adrenérgica do miocárdio, seja por aumento reflexo da atividade simpática devido à hipotensão causada pela queda do débito cardíaco, seja pela injeção de adrenalina para tentar reverter a assistolia (Tsagkatakaki *et al.*, 2008). Portanto, consideramos importante investigar como a ativação de receptores β -adrenérgicos modificam a vulnerabilidade miocárdica ao efeito letal de E de alta

intensidade. Na presença de 10 nM ISO (uma concentração submáxima do agonista, razoavelmente compatível com os níveis fisiológicos de estimulação, Carvalho *et al.*, 2006), observou-se que E_T e ΔV_T foram menores, enquanto que a amplitude da contração foi 75% maior do que na ausência do agonista. Este último resultado já era esperado, pois já é conhecido que a estimulação β -adrenérgica tem um efeito inotrópico positivo (Bers, 2001; Soriano *et al.*, 2007). Os menores valores de E_T e ΔV_T , que caracterizam maior sensibilidade à excitação pelo campo elétrico, poderiam, a princípio, ser explicados por uma possível despolarização diastólica da membrana, como observado em miócitos ventriculares de humanos sob estimulação β -adrenérgica por Koumi *et al.* (1995b). Porém, estes autores usaram concentrações supramáximas de ISO (na faixa micromolar), bem superiores à concentração usada nos presentes experimentos (10 nM), que pode ser insuficiente para alterar V_m diastólico. Consideramos mais provável que nossos resultados possam ser explicados, pelo menos em parte, pelos seguintes mecanismos:

a) A estimulação β -adrenérgica diminui a corrente retificadora de entrada de K^+ (Koumi *et al.*, 1995a,b; Bers, 2001; Pogwizd *et al.*, 2001), principal componente da condutância iônica da membrana em repouso, o que levaria a aumento da resistência total da membrana. Isto tornaria mais fácil para correntes despolarizantes (e.g., de Na^+) causarem o disparo de um PA, o que poderia diminuir a despolarização necessária para que o potencial limiar fosse atingido (ΔV_T).

b) A estimulação β -adrenérgica aumenta a corrente de Na^+ , devido ao aumento do número de canais funcionais no sarcolema que medeiam a corrente de Na^+ voltagem-dependente (Lu *et al.*, 1999). Isto poderia elevar a probabilidade de disparo de um PA com uma menor ΔV_m induzida pelo E , o que levaria a redução de E_T e ΔV_T .

Os resultados das curvas de letalidade na presença de ISO foram surpreendentes: todas as curvas de letalidade (em função de E , bem como de V_{e-max}) deslocaram-se para a direita com relação à condição controle (Figura 4.13), o que indica aumento da tolerância celular ao efeito letal do campo elétrico. O aumento do coeficiente de Hill indica que o efeito protetor do ISO foi restrito a campos de menor intensidade (50-80 V/cm), mas não se manifestou para valores mais altos de E , para os quais a letalidade foi semelhante àquela em células controles (80-130 V/cm). Krauthamer & Smith, (2004) relataram que a estimulação de adrenoceptores β encurta o período de inatividade elétrica (atribuído à eletroporação) após choque do tipo desfibrilatório em cultura de células cardíacas. Estes resultados são consistentes com os nossos, já que sugerem menor grau de eletroporação (e/ou reparo mais eficiente) em resposta a choques de uma dada amplitude.

Consideramos três possibilidades não exclusivas para explicar o efeito protetor do ISO:

a) ISO modificaria as propriedades da membrana, tornando-a mais resistente à ΔV_m induzida pelo **E** de alta intensidade. Os poros hidrofílicos formados a partir de poros hidrofóbicos devido à eletroporação podem ser reversíveis se não ultrapassarem um raio crítico (Tsong, 1991; Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; DeBruin & Krassowska, 1999; Smith *et al.*, 2004). Todo o processo, desde a abertura dos poros hidrofílicos até seu fechamento, demora de segundos a minutos, para pulsos estimulatórios com duração na faixa de μs a ms (Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999), e tanto sua formação quanto sua reversão para poros hidrofóbicos depende da fluidez da membrana: quanto menos fluida a membrana menor a chance de formar o poro e maior a chance de desfazê-lo (Weaver & Chizmadzhev, 1996a). Em membranas planares, foi observado um menor limiar de eletroporação quando era adicionado um agente surfactante, que diminui a tensão superficial da membrana (i.e., aumenta a fluidez, Troiano *et al.*, 1998). Observou-se, ao contrário, maior limiar de eletroporação quando é adicionada gramicidina, que se incorpora à membrana e a estabiliza (diminui a fluidez, Troiano *et al.*, 1999). Um conhecido estabilizante de membrana é o propranolol (Godin *et al.*, 1976; Welman, 1979; Anderson *et al.*, 1996), que, ao contrário do ISO, é um β -bloqueador. Assim, seriam esperados mais altos limiar de eletroporação e valor de EL50 se ISO diminuísse a fluidez da membrana. Porém, não achamos nenhuma evidência na literatura de que o ISO interaja diretamente com a fase lipídica da membrana e altere sua fluidez, embora esta possibilidade não possa ser totalmente descartada.

b) Estimulação pelo ISO da remoção de Ca^{2+} do citosol. Não há evidência conclusiva de que a NCX seja modulada pela estimulação β -adrenérgica (Lin *et al.*, 2006). Já a taxa de captação de Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS é sabidamente aumentada pela estimulação β -adrenérgica (Bers, 2001). No entanto, apesar do RS contribuir para minorar a sobrecarga de $[Ca^{2+}]_i$ após o choque (Figura 4.7), a inibição da função do RS por TG não causou aparente aumento da sensibilidade das células à aplicação de campos elétricos de alta intensidade. Por exemplo, **E** de intensidade 12-15x E_T , que têm baixa probabilidade de letalidade (Oliveira, 2004), causaram aumento transitório de $[Ca^{2+}]_i$ tanto antes quanto depois do tratamento com TG. Portanto, parece pouco provável que maior atividade do RS *per se* seja responsável pelo deslocamento à direita das curvas de letalidade de células na presença de ISO. Porém, é necessária investigação mais profunda deste possível mecanismo.

c) ISO potencializaria os mecanismos de reparo da membrana. Estes mecanismos apresentam um componente rápido (que pode durar ms ou menos) e um mais lento (que dura de segundos a minutos). O reparo rápido consiste na reversão dos poros hidrofílicos em hidrofóbicos, e depende somente da tensão superficial da membrana (Weaver & Chizmadzhev, 1996a; McNeil & Steinhardt, 2003). Em células nucleadas, este mecanismo leva ao reparo de pequenas rupturas (<0,2 μm de diâmetro, McNeil & Steinhardt, 2003). O reparo lento consiste no re-selamento da membrana. Os resultados de nossos experimentos na ausência nominal de Ca^{2+} extracelular (Figura 4.3) sugerem que os poros só se fecham totalmente após a volta do Ca^{2+} externo para nível milimolar, já que, mesmo após 5 min após o choque, o retorno do Ca^{2+} extracelular ainda causava acumulação intracelular de Ca^{2+} . Este processo de reparo é fortemente dependente da proteína quinase C (PKC, McNeil & Steinhardt, 2003). Embora não possamos afirmar que a PKC seja ativada pelo ISO, o mecanismo de ação deste agonista β -adrenérgico certamente inclui ativação da PKA (Bers, 2001). A estimulação da PKA aumenta a secreção de insulina em células beta pancreáticas (Lee *et al.*, 2003; Yang & Gillis, 2004; Shimono *et al.*, 2005), e potencializa o auto-reparo de células de córnea de coelho perfuradas mecanicamente (Shen & Steinhardt, 2005).

Shen & Steinhardt (2005) observaram que a estimulação da PKA não tem efeito facilitador do reparo da membrana quando a PKC está bloqueada, e propuseram que a PKA age como coadjuvante da PKC no processo de re-selamento, potencializando seu efeito. Nossa hipótese inicial foi a de que o aumento da mobilização de Ca^{2+} do citosol resultante da estimulação da PKA contribuiria para a ativação da PKC em miócitos cardíacos, facilitando assim o reparo do sarcolema e aumentando a resistência a **E** de intensidade moderadamente alta. Testamos esta hipótese nos experimentos em que o choque foi aplicado na ausência de Ca^{2+} externo, após esvaziamento dos estoques do RS. Nestes experimentos, as células não foram eletricamente estimuladas durante a exposição ao ISO com o objetivo de manter $[\text{Ca}^{2+}]_i$ baixa em ambos os grupos controle e ISO. Nestas condições, observamos que as células do grupo 0Ca^{2+} (controle) foram menos sensíveis ao efeito letal de **E**, comparado com o grupo controle no qual o choque foi aplicado na presença de 1 mM Ca^{2+} (Tabelas 4.7 e 4.8). Uma possível explicação para esta menor sensibilidade é a de que a troca da solução Tyr-0Ca por NT não foi imediata, ocorrendo um aumento gradual de Ca^{2+} externo. Assim, entre a aplicação do choque e o retorno de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para 1 mM, poderia ter havido fechamento de uma parte dos poros pelos mecanismos de reparo, o que poderia ter exercido um efeito protetor. No entanto,

para nossa surpresa, esta redução de sensibilidade pela aplicação do choque na ausência de Ca^{2+}_o não ocorreu na presença de ISO, de modo que o efeito protetor do ISO foi abolido nesta condição (i.e., comparado ao mesmo protocolo na ausência de ISO; Tabela 4.8 e Figura 4.14). Parece plausível, portanto, concluir que os efeitos dessensibilizantes da remoção de Ca^{2+} extracelular e de ISO não são aditivos. Isto pode indicar que ambos os efeitos protetores (i.e., da ausência de Ca^{2+} durante o choque e do ISO) são mediados pelo mesmo mecanismo, possivelmente reparo de membrana.

O efeito da remoção de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sobre a susceptibilidade celular ao efeito letal de **E** na ausência de ISO certamente complicou a interpretação dos resultados frente à nossa hipótese inicial. No entanto, tal manobra foi absolutamente necessária para minimizar diferenças de mobilização de Ca^{2+} citosólico na presença e ausência do agonista. O resultado final é que, quando estas diferenças são minimizadas, não mais se observa o efeito protetor do ISO. É importante, portanto, que se investigue futuramente se de fato o reparo de membrana é o mecanismo subjacente a ambos os efeitos, e especialmente o papel de enzimas envolvidas neste mecanismo, como a PKC e a PKA.

A estimulação β -adrenérgica apresentou efeitos qualitativos semelhantes aos do pulso bifásico: diminuiu E_T e ΔV_T , e reduziu a sensibilidade ao efeito letal de **E**. Foi descrita redução também do limiar desfibrilatório durante a estimulação β -adrenérgica (Kalus *et al.*, 2005). Portanto, a estimulação β -adrenérgica deveria, teoricamente, contribuir para maior efetividade e menor risco na desfibrilação. Mas a estimulação β -adrenérgica aumenta o consumo de O_2 , o que pode ser um problema na isquemia miocárdica (já discutido), e facilita a fibrilação (Han *et al.*, 1964). O uso de agonistas β -adrenérgicos na terapia emergencial da fibrilação ventricular tem sido bastante discutido. Embora doses moderadas de adrenalina tenham sido recomendadas nos casos de assistolia, argumenta-se que não há evidência clara de efeitos benéficos em humanos, apesar de haver relatos de benefício em animais (Tsagkatakaki *et al.*, 2008). Há relatos de maior taxa de recuperação espontânea da circulação e maior porcentagem de pacientes vivos ingressando no hospital após tratamento emergencial com adrenalina vs. não tratados com o agonista ou submetidos a desfibrilação elétrica (embora a porcentagem de altas hospitalares não tenha sido diferente, Herlitz *et al.*, 1995). No entanto, como reconhecido pelos próprios autores, é provável a existência de viés devido ao fato de que nenhum dos pacientes tratados com adrenalina tenha sido também desfibrilados eletricamente.

A estimulação β -adrenérgica massiva, como a produzida por altas doses de catecolaminas, pode ter efeitos pró-arrítmicos em preparações ventriculares, tanto associados a geração de atividade espontânea relacionada à sobrecarga de Ca^{2+} (e.g., Bassani & Bassani, 2003b; Boer, 2006; ter Keurs & Boyden, 2007), quanto a facilitação de reentrância devido a encurtamento da refratariedade elétrica (Tovar & Jones, 1997). Por outro lado, o aumento da excitabilidade pela estimulação β -adrenérgica pode estar associado à queda do limiar de desfibrilação observado em humanos com cardioversores implantáveis (Kalus *et al.*, 2005). São de particular relevância os resultados descritos por Tang *et al.* (2001) a partir de experimentos *in vivo*, que indicam queda da energia do choque requerida para desfibrilação tanto com o uso de ondas bifásicas, quanto com a infusão de adrenalina. Embora a variabilidade tenha sido bem alta, uma análise da energia média obtida revela que a combinação de choques bifásicos com estimulação β -adrenérgica causou uma considerável diminuição (75%) da energia do choque desfibrilatório, particularmente após fibrilação ventricular prolongada. Nossos resultados em miócitos isolados indicam que o tratamento com baixa concentração de ISO é capaz de aumentar em 25% o fator de segurança da estimulação elétrica (LE_{50}/E_{τ}). Portanto, torna-se evidente a necessidade de que se explore melhor os possíveis benefícios da utilização da estimulação β -adrenérgica de intensidade relativamente baixa (i.e., insuficiente para franca pró-arritmia) na facilitação e proteção miocárdica durante a desfibrilação elétrica.

Uma condição frequentemente presente num paciente que requer desfibrilação é a elevação dos níveis plasmáticos dos chamados hormônios de *stress* (catecolaminas e glicocorticóides), evocada por má perfusão dos tecidos, dor, inflamação, etc. Para simular a condição de aumento da atividade adrenérgica, utilizamos a aplicação de ISO *in vitro*. No entanto, para evocar a reação de *stress*, foi necessário utilizar manobras *in vivo*, das quais selecionamos os modelos de contenção física (imobilização) e estimulação elétrica dolorosa (choque nas patas), que já têm sido estudados neste laboratório (e.g., Bassani & Bassani, 1993; Silveira *et al.*, 2003), e são modelos amplamente utilizados por outras equipes (Nourani *et al.*, 1992; Spadari-Bratfisch *et al.*, 1999; Hudecova *et al.*, 2007).

Observamos que miócitos de animais nos quais *stress* foi induzido por ambos os protocolos foram mais resistentes a **E** (Tabela 4.10 e Figura 4.16), embora este efeito não tenha sido tão acentuado quanto aquele observado para o ISO. É importante notar que, no grupo Imobilização (no qual o desvio da curva foi maior), pode ter havido alguma interferência (particularmente na curva em função de $V_{e\text{-max}}$) das dimensões celulares,

uma vez que o comprimento das células neste grupo tendeu a ser maior do que nos outros.

É pouco provável que este resultado seja devido à estimulação adrenérgica aguda, já que os experimentos foram realizados várias horas após a remoção do coração, e neste período, além da eliminação das catecolaminas endógenas, a reversão do efeito destes agonistas sobre mecanismos celulares já pode ser considerada completa. Portanto, consideramos que este resultado possa estar relacionado com o aumento da concentração plasmática de glicocorticóides em resposta ao *stress* (Sapolsky *et al.*, 2000). Estes hormônios, por serem lipo-solúveis, podem penetrar nas células e, em teoria, poderiam permanecer ligados a sítios intracelulares (ou de membrana) mesmo após o isolamento dos miócitos. Embora estes hormônios tenham ação primariamente genômica, vários autores relatam também ações não-genômicas (Qiu *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2002). Os glicocorticóides, dentre outras ações, causam elevação da atividade da PKC, conforme observado por Maddalia *et al.* (2005) em artérias coronárias de porco, e por Qiu *et al.* (1998) em células PC12. Este aumento pode potencializar o processo de re-selamento, conforme discutido anteriormente, exercendo assim um efeito protetor.

Outra ação importante dos glicocorticóides é sobre a fluidez da membrana, a qual, se reduzida, poderia diminuir a probabilidade de eletroporação para choques de uma dada intensidade. No entanto, há relatos tanto de aumento (Keating *et al.*, 1988; Van Laethem *et al.*, 2003), quanto de redução (Gerritsen *et al.*, 1991; Micheli *et al.*, 1994) da fluidez da membrana por glicocorticóides. Assim, esta possibilidade ainda necessita ser investigada.

Ainda é possível o envolvimento de alterações de origem genômica decorrentes da ação de agentes neuro-humorais (mediadores simpáticos, glicocorticóides, etc.) liberados durante à exposição repetida a situação geradora de *stress*, e que podem, de algum modo, afetar a resposta celular a campos de alta intensidade.

5.4 – RESUMO E CONCLUSÕES

Um dos objetivos deste trabalho foi identificar mecanismos envolvidos na disfunção contrátil e morte celular causadas pela aplicação de pulsos de alta intensidade. Em conjunto, nossos resultados são consistentes com a hipótese de que, na faixa de intensidade de **E** estudada, ambos os efeitos advêm da sobrecarga de $[Ca^{2+}]_i$ devida unicamente ao influxo do íon, porém não pelas principais vias de transporte presentes no sarcolema íntegro, mas provavelmente através de poros resultantes de eletroporação da membrana. Foi possível também identificar um papel de organelas internas (RS e

possivelmente mitocôndrias) no amortecimento da acumulação citosólica de Ca^{2+} . Concluímos ainda que a morte celular ocorre caso não haja reversão da acumulação de Ca^{2+}_i , a qual possivelmente ocorre por fechamento dos eletroporos, processo este que requer Ca^{2+} , em associação ao transporte que promove remoção de Ca^{2+} do citosol.

De uma maneira geral, procurávamos condições que protegessem as células dos efeitos deletérios da estimulação por campos de alta intensidade. Esta proteção foi encontrada pela estimulação β -adrenérgica moderada *in vitro* e pela indução de *stress in vivo*. No primeiro caso, os presentes resultados apontam a possível participação de mecanismos de reparo da membrana. Identificamos ainda uma influência marcante da forma de onda do estímulo: para uma dada duração, choques bifásicos foram menos potentes na produção de lesão celular irreversível. Este resultado, descrito pela primeira vez no presente estudo, representa uma contribuição para o desenvolvimento de procedimentos mais seguros, tanto para desfibrilação, quanto para estimulação marca-passo do coração.

Esperamos que os resultados obtidos no presente trabalho possam ser aproveitados em futuros estudos com campos de alta intensidade e contribuir para o desenvolvimento de técnicas de desfibrilação mais eficientes.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ai, X.; Curran, J.W.; Shannon, T.R.; Bers, D.M.; Pogwizd, S.M. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ. Res.* 97:1314-22, 2005.
- Aidley, D.J. The physiology of excitable cells. Cambridge University Press, Cambridge, USA, 1989.
- Al-Khadra, A., Nikolski, V., Efimov, I.R., The role of electroporation in defibrillation. *Circ. Res.*, 87: 797-804, 2000.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart disease and stroke statistics – 2004 update. Disponível em: <<http://www.americanheart.org>> Acesso em 04 maio.2004.
- Anderson, R.; Ramafi, G.; Theron, A.J. Membrane stabilizing, anti-oxidative interactions of propranolol and dexpropranolol with neutrophils. *Biochem. Pharmacol.*, 52:341-9, 1996.
- Avitall, B.; Port, S.; Gal, R.; McKinnie, J.; Tchou, P.; Jazayeri, M.; Troup, P.; Aktar, M. Automatic implantable cardioverter / Defibrillator discharges and acute myocardial injury. *Circulation*, 81: 1482-1487, 1990.
- Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of Na^+/Ca^{2+} exchange to ventricular myocyte relaxation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36: 1717-1723, 2003a.
- Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Calibration of indo-1 and resting intracellular $[Ca]_i$ in intact rabbit cardiac myocytes. *Biophys J.* 68: 1453-1460, 1995a.
- Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A.; Bers, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.*, 476: 279-293, 1994.
- Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 282: H2406-H2413, 2002.
- Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A.; Bers, D. M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 265: C533-C540, 1993.
- Bassani, J. W. M.; Bassani, R. A. Effects of escapable and inescapable foot-shock on rat atrial beta-adrenoceptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 869-875, 1993.

- Bassani R.A., Bassani J.W.M. Papel do Ca^{2+} na geração de arritmias cardíacas: quando a hierarquia é subvertida. *Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo* 13: 693-706, 2003b.
- 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. *Physiol. Meas.*, 27:851-863, 2006.
- Bassani, R.A.; Altamirano, J.; Puglisi, J.L.; Bers, D.M. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 559:591-607, 2004.
- Bassani, R.A.; Bassani, J.W.M.; Lipisius, S.L.; Bers, D.M.; Diastolic Ca efflux from SR in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 273: 886-892, 1997.
- Bassani, R. A. & Bers, D. M. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.*, 26: 1335-1347, 1994.
- 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. *J. Physiol.*, 453: 591-608, 1992.
- Bassani, R. A.; De Moraes, S. Effects of repeated footshock stress on the responsiveness of the isolated rat pacemaker to catecholamines: role of beta-2 adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 246: 316-321, 1988.
- Bers, D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2 ed. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Boer, D.C. Arritmogenese por Catecolaminas em Miocárdio Atrial e Ventricular de Ratos : Metodologia e Tipos de Adrenoceptores. Tese de mestrado. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2006.
- Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. Calcium: a life and death signal. *Nature*. 395:645-648, 1998.
- Carvalho, B. M. ; Bassani, R. A. ; Franchini, K. ; Bassani, J. W. M. Enhanced calcium mobilization in rat ventricular myocytes during the onset of pressure overload-induced hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291: H1803-H1813, 2006.
- Cheek, E.R.; Fast, V.G. Nonlinear changes of transmembrane potential during electrical shocks. Role of membrane electroporation. *Circ. Res.*, 94: 208-214, 2004.
- Cheng, D.K.L.; Tung, L.; Sobie, E.A. Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 46: H351-H362, 1999.
- Curran, J.; Hinton, M.J.; Rios, E.; Bers, D.M.; Shannon, T.R. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ. Res.* 100:391-8, 2007.

- Dahl, C.F.; Ewy G.A.; Warner E.D.; Thomas E.D. Myocardial necrosis from direct current countershock: effect of paddle electrode size and time interval between discharges. *Circulation*, 50: 956-961, 1974.
- DeBruin, K.A.; Krassowska, W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. *Biophys. J.*, 77: 1213-1224, 1999.
- Fabiato, A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 245: C1-C14, 1983.
- Faddy, F.C., Powell, J., Craig, J.C. Biphasic and monophasic shocks for transthoracic defibrillation: a meta analysis of randomised controlled trials. *Resuscitation*, 58: 9-16, 2003.
- Garcia, E.A.C. Biofísica. Sarvier, São Paulo, Brasil, 1997.
- Gabriel B.; Teissié, J. Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of the membrane property change during the pulse. *Biophys. J.* 76: 2158-2165, 1999.
- Gazmuri R.J.; Weil, M.H.; Bisera, J.; Tang, W.; Fukui, M; McKee, D. Myocardial dysfunction after successful resuscitation from cardiac arrest. *Crit. Care Med.*, 24: 992-1000, 1996.
- Gerritsen, M.E.; Schwarz, S.M.; Medow, M.S. Glucocorticoid-mediated alterations in fluidity of rabbit cardiac muscle microvessel endothelial cell membranes: influences on eicosanoid release. *Biochim. Biophys. Acta.* 1065:63-8, 1991.
- Godin, D.V.; Ng, T.W.; Tucek, J.M. Studies on the interaction of propranolol with erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 436:757-73, 1976.
- Gomes, P.A.P. Aplicação de Técnicas de Engenharia no Estudo de Células Cardíacas Isoladas: Medição de $[Ca^{2+}]_i$ e Limiar de Estimulação. Tese de doutoramento. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 1997.
- Gomes P.A.P; Bassani R.A., Bassani J.W.M. Measuring Ca^{2+} with fluorescent indicators: theoretical approach to the ratio method. *Cell Calcium* 24: 17-26, 1998.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
- Günter T.E., Gunter K.K., Sheu S.S., Gavin, C.E. Mitochondrial Ca^{2+} transport: physiological, pathological relevance. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 267: C313-C339, 1994.
- Han, J.; Lin, W.; Lou, S.; Qiu, J.; Chen, Y. A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1591: 21– 27, 2002.
- Han, J.; de Jalon, G.; Moe, G.K. Adrenergic effects on ventricular vulnerability. *Circ Res.* 14: 516–524, 1964.

- Han S.; Schieffer A.; Isenberg G. Ca^{2+} load of guinea-pig myocytes determines efficacy of brief Ca^{2+} currents as trigger for Ca^{2+} release. *J. Physiol.* 480: 411-421, 1994.
- Haest C.W.; Kamp D.; Deuticke B. Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1325:17-33, 1997.
- Herlitz, J; Ekström, L; Wenneblom, B.; Axelsson, A; Bang, A; Holmberg, S. Adrenaline in out-of-hospital ventricular fibrillation. Does it make any difference? *Resuscitation.* 29: 195-201, 1995.
- Hudecova, S.; Kubovcakova, L.; Kvetnansky, R.; Kopacek, J.; Pastorekova, S.; Novakova, M.; Knezl, V.; Tarabova, B; Lacinova, L; Sulova, Z.; Breier, A.; Jurkovicova, D.; Krizanova, O. Modulation of expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in heart of rat and mouse under stress. *Acta Physiol (Oxf)*. 190(2):127-36, 2007.
- Jones, J.L., Jones R.E., Balasky G. Microlesion formation in myocardial cells by high-intensity electric field stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 253: H480-H486, 1987.
- Jones, J.L., Lepeschkin E., Jones R.E., Rush S. Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 235: H214-H222, 1978.
- Jones, J.L.; Proskaver, C.C.; Paull, W.K.; Lepeschkin, E.; Jones, R.E. Ultrastructural injury to chick myocardial cells in vitro following "electric countershock". *Circ. Res.*, 46: 387-394, 1980.
- Kalus, J.S.; White, C.M.; Caron, M.F.; Guertin, D.; McBride, B.F; Kluger, J. The impact of catecholamines on defibrillation threshold in patients with implanted cardioverter defibrillators. *Pacing. Clin. Electrophysiol.* 28: 1147-1156, 2005.
- Keating, K.M.; Barisas, B.G.; Roess, D.A. Glucocorticoid effects on lipid lateral diffusion and membrane composition in lipopolysaccharide-activated B-cell leukemia 1 cells. *Cancer Res.* 48:59-63, 1988.
- Klee, M; Plonsey, R. Stimulation of spheroidal cells. The role of cell shape. *IEEE - Trans. Biom. Eng.*, BME-23: 347-354, 1976.
- Knisley, S.B.; Grant, A.O. Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes. *J. Mol. Cel. Cardiol.*, 27: 1111-1122, 1995.
- Kohlhaas, M. ; Zhang, T.; Seidler, T.; Zibrova, D.; Dybkova, N.; Steen, A.; Wagner, S.; Chen, L.; Bers, D.M.; Maier, L.S. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. *Circ. Res.* 98:235-44, 2006.
- Koumi, S.; Backer, C.L.; Arentzen, C.E.; Sato, R. β -Adrenergic modulation of the inwardly rectifying potassium channel in isolated human ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* 96: 2870-2881, 1995b.

- Koumi S., Wasserstrom J.A., Ten Eick R.E. Beta-adrenergic and cholinergic modulation of inward rectifier K⁺ channel function and phosphorylation in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 486: 647-659, 1995a.
- Krassowska W. Effects of electroporation on transmembrane potential induced by defibrillation shocks. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 18:1644-60., 1995.
- Krauthamer, V.; Smith, T.C. Acute effects of adrenergic agents on post-defibrillation arrest time in a cultured heart model. *Cell Mol Life Sci.* 61: 3093-3099, 2004
- Krauthamer, V.; Jones, J.L. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. *Life Sci.* 60: 1977-1985, 1997.
- Krauthamer, V.; Jones, J.L. Effects of biphasic electric shocks on calcium changes in cultured cardiac myocytes. *In Vitro Mol. Toxicol.* 11: 221-228, 1998.
- Lee, I.; Hur, E.; Suh, B.; Kim, M.; Koh, D.; Rhee, I.; Ha, H.; Kim, K. Protein kinase A- and C- induced insulin release from Ca²⁺-insensitive pools. *Cell. Signal.*, 15: 529-537, 2003.
- Li, H.G.; Jones, D.L.; Yee, R.; Klein, G.J. Defibrillation shocks increase myocardial pacing threshold: an intracellular microelectrode study. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 260: H1973-H1979, 1991.
- Li, Q.; Hohl, C.M.; Altschuld, R.A.; Stokes, B.T. Energy depletion-repletion and calcium transients in single cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 257: C426-C434, 1989.
- Lin, X; Jo, H.; Sakakibara, Y.; Tambara, K.; Kim, B.; Komeda, M.; Matsuoka, S. Beta-adrenergic stimulation does not activate Na⁺/Ca²⁺ exchange current in guinea pig, mouse, and rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290:C601-8, 2006.
- Lu, T.; Lee, H.-C.; Kabat, J. A.; Shibata, E. F. Modulation of rat cardiac sodium channel by the stimulatory G protein α subunit. *J. Physiol.*, 518: 371-384, 1999.
- Lukyanenko V.; Viatchenko-Karpinski S.; Smirnov A.; Wiesner T.F.; Gyorke S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content and release by luminal Ca²⁺-sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.*, 81: 785-798, 2001.
- Maddali, K.K.; Korzick, D.H.; Turk, J.R.; Bowles, D.K. Isoform-specific modulation of coronary artery PKC by glucocorticoids. *Vasc. Pharmacol.* 42:153–162, 2005.
- Maier, L.S.; Zhang, T.; Chen, L.; DeSantiago, J.; Brown, J.H.; Bers, D.M. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca²⁺ handling: reduced SR Ca²⁺ load and activated SR Ca²⁺ release. *Circ. Res.* 92:904-11, 2003.
- Malmivuo, J.; Plonsey, R. Bioelectromagnetism. Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields. Oxford University Press, New York, USA, 1995.
- Marx, S.O.; Reiken, S.; Hisamatsu, Y.; Jayaraman, T.; Burkhoff, D.; Rosemblyt, N.; Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365-376, 2000.

- McNeil P.L.; Steinhardt R.A. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu. Rev. Cell. Rev. Biol.* 19: 697-731, 2003.
- Miccheli, A.; Tomassini, A.; Ricciolini, R.; Di Cocco, M.E.; Piccolella, E.; Manetti, C.; Conti, F. Dexamethasone-dependent modulation of cholesterol levels in human lymphoblastoid B cell line through sphingosine production. *Biochim. Biophys. Acta.* 1221:171-177, 1994.
- Minta, A.; Kao, J. P.; Tsien, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264: 8171-8178, 1989.
- Moura, S. P.; Soares, G. S.; Bassani, R. A. ; Bassani, J.W.M. Estimulador elétrico de alta potência para experimentos fisiológicos. *III Congresso Latino-Americano de Engenharia Biomédica*, João Pessoa, PB. Setembro de 2004 (anais, v. 01 CD. p. 837-840).
- Nourani, F.R.R.; Spadari, R.C.; De Moraes, S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen. Pharmacol.*, 23: 787-791, 1992.
- Oliveira P.X. Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. UNICAMP, 28 Julho de 2004.
- Oliveira P.X., Bassani R.A., Bassani J.W.M. Lethal electrical field and membrane depolarization in rat ventricular myocytes. *V Iberoamerican Congress of Biophysics*. Rio de Janeiro, RJ. Outubro de 2003 (Anais, p. 139).
- Opie, L.H. The Heart: Physiology from Cell to Circulation. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publ. 1998.
- Piacentino, V. III, Weber; C.R.; Chen, X; Weisser-Thomas, J.; Margulies, K.B.; Bers, D.M.; Houser, S.R. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ. Res.* 92: 651–658, 2003
- Pogwizd, S.M.; Schlotthauer, K.; Li, L.; Yuan, W.; Bers, D.M. Arrhythmogenesis and Contractile Dysfunction in Heart Failure. *Circ Res.*, 88:1159-1167, 2001.
- Post, J.A.; Langer, G.A.; Op den Kamp, J.A.; Verkleij, A.J. Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and 'gas-dissected' membranes. *Biophys. Biochem. Acta.*, 943:256-66, 1998.
- Qiu, J.; Lou, L.; Huang, X.; Lou, S.; Pei, G.; Chen, Y. Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: Involvement of Protein Kinase C*. *Endocrinology*, 139: 5103–5108, 1998.
- Ricardo R.A. Atividade Contrátil e Mobilização de Cálcio em Miócitos Ventriculares na Presença de Solução Hiperosmótica de NaCl. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. UNICAMP, 2005.

- Ricardo, R.A.; Bassani, R.A.; Bassani, J.W.M. Osmolality- and Na⁺-dependent effects of hyperosmotic NaCl solution on contractile activity and Ca²⁺ cycling in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch. Eur J Physiol* 455:617-26, 2008.
- Ricardo, R. A.; Oliveira, P. X.; Bassani, R. A.; Bassani, J. W. M. Compact cell image projector: application to study the relationship between stimulus interval and contraction amplitude in isolated cardiomyocytes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 22: 151-160, 2007.
- Rols M.P.; Teissié J. Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys. J.*, 75: 1415-1423, 1998.
- Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55-89, 2000.
- Savitzky, A.; Golay, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.*, 36: 1627-1639, 1964.
- Silveira, A.C.; Gilioli, R.; Oliveira, E.S; Bassani, R.A. Subsensitivity to beta-adrenergic stimulation in atria from rats infested with *Syphacia* sp. *Lab Anim.*, 37: 63-67, 2003.
- Shannon T.R., Ginsburg K.S., Bers D.M. Quantitative assessment of the SR Ca²⁺ leak-load relationship. *Circ. Res.*, 91: 594-600, 2002.
- Shannon, T. R.; Ginsburg, K. S.; Bers, D. M. Potentiation of fractional SR Ca²⁺ release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys J.*, 78: 334-343, 2000.
- Schlotthauer K.; Bers D.M. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release causes myocyte depolarization: underlying mechanism and threshold for triggered action potentials. *Circ. Res.*, 87: 774-780, 2000.
- Shen, S.S.; Steinhardt, R.A. The mechanisms of cell membrane resealing in rabbit corneal epithelial cells. *Curr. Eye Res.*, 7: 543-554, 2005.
- Shimono, D.; Fujimoto, S.; Mukai, E.; Takehiro, M.; Nabe, K.; Radu, R.G.; Shimodahira, M.; Kominato, R.; Aramaki, Y.; Nishi, Y.; Funakoshi S.; Yamada, Y.; Seino, Y. ATP enhances exocytosis of insulin secretory granules in pancreatic islets under Ca²⁺-depleted condition. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 69: 216-223, 2005.
- Smith, K.C.; Neu, J.C.; Krassowska, W. Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. *Biophys J.*, 86: 2813-2826, 2004.
- Soares, G.S. Comprometimento Contrátil do Tecido Cardíaco Isolado Após Estimulação com Campo Elétrico de Alta Intensidade. Tese de mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2003.
- Soriano, D.C. Modelo Experimental e Instrumentação para Estudo da Função do Retículo Sarcoplasmático no Transporte de Ca²⁺ no Coração. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. UNICAMP, 2007.

- Spadari-Bratfisch, R.C.; Santos, I.N.; Vanderlei, L.C.M.; Marcondes, F.K. Pharmacological evidence for β_2 -adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 77: 1-6, 1999.
- Tang, W.; Weil M.H.; Sun S.; Gazmuri R.J.; Bisera J. Progressive myocardial dysfunction after cardiac resuscitation. *Crit. Care Med.*, 21: 1046-1050, 1993.
- Tekle, E.; Astumian, R.D.; Chock, P.B. Electro-permeabilization of cell membranes: effect of the resting membrane potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 282-287, 1990.
- Ter Keurs, H.E.D.J; Boyden, P.A. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol. Rev.* 87: 457-506, 2007.
- Teruel, M.N., T. Meyer. Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the body and processes of adherent cells. *Biophys. J.* 73:1785-1796, 1997.
- Tovar O.; Jones, J.L. Epinephrine facilitates cardiac fibrillation by shortening action potential refractoriness. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 1447-1455, 1997
- Tovar, O.; Tung, L. Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 263: H1128-H1136, 1992.
- Trafford A.W., Díaz M.E., Negretti N., Eisner D.A. Enhanced Ca^{2+} current and decreased Ca^{2+} efflux restore sarcoplasmic reticulum content after depletion. *Circ. Res.*, 81: 477-484, 1997.
- Troiano, G.C.; Stebe, K.J.; Raphael, R.M.; Tung, L. The effects of gramicidin on electroporation of lipid bilayers. *Biophys. J.* 76: 3150-3157, 1999.
- Troiano, G.C.; Tung, L.; Sharma, V.; Stebe, K.J. The reduction in electroporation voltages by addition of a surfactant to planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 75: 880-888, 1998.
- Tsgakatakaki, M.; Levine, A.; Strang, T; Dunning, J. Should adrenaline be routinely used by the resuscitation team if a patient suffers cardiac arrest shortly after cardiac surgery? *Interact. Cardiovasc. Thoracic Surg.* (no prelo; doi: 10.1510/icvts.2007.171447), 2008.
- Tsien R.W., Ellinor P.T., Horne W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 12: 349-354, 1991.
- Tsong, T.Y. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.*, 60: 297-306, 1991.
- Tung, L. Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle. *Proc. IEEE* , 84:366-378, 1996.
- Tung, L.; Tovar, O., Neunlist, M.; Jain, S.K; O'Neill, R.J. Effects of strong electrical shock on cardiac muscle tissue. *Ann. NY Acad. Sci.*, 720:160-175, 1994.
- Van Laethem, F.; Liang, X.; Andris, F.; Urbain, J.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.M.; Resh, M.D.; Stulnig, T.M.; Leo, O. Glucocorticoids alter the lipid and protein composition of membrane rafts of a murine T cell hybridoma. *J. Immunol.* 170: 2932-2939, 2003.

- Vernier, P.T.; Sun, Y. ; Gundersen, M.A. Nanopulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization. *BMC Cell Biol.*, 7:37 (doi: 10.1186/1471-2121-7-37), 2006.
- Weaver, J.C. Molecular basis for cell membrane electroporation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 720: 141-152, 1994.
- Weaver, J.C.; Chizmadzhev, Y. Electroporation. In: Polk, C.; Postow, E. (Ed.). Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields. 2. ed. Boston: CRC Press, 1996 a. p. 247 – 274.
- Weaver, J.C.; Chizmadzhev, Y. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41: 135-160, 1996b.
- Welman, E. Stabilization of lysosomes in anoxic myocardium by propranolol. *Br. J. Pharmacol.*, 65:479-82, 1979.
- Yabe,S.; Smith, W.M.; Daubert, J.P.; Wolf, P.D.; Rollins, D.L.; Ideker, R.E. Conduction disturbances caused by high current density electric fields. *Circ. Res.*, 66: 1191-1203, 1990.
- Yang, Y.; Gillis, K.D. A highly Ca²⁺-sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *J. Gen. Physiol.* 124: 641-651, 2004.
- Xie, J.; Weil, M.H.; Sun, S.; Tang, W.; Sato, Y.; Jin, X.; Bisera, J. High-energy defibrillation increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation*, 96:683-688, 1997.
- Zhang, T. ; Maier, L.S. ; Dalton, N.D. ; Miyamoto, S. ; Ross, J.J. ; Bers, D.M.; Brown, J.H. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res.* 92:912-919, 2003.

APÊNDICE - A

A.1 PROGRAMAS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO

Os programas foram desenvolvidos com o auxílio da ferramenta GUIDE do MatLab (versão 7.1, MathWorks Inc., Natick, MA).

A.1.1 Analisador de encurtamento e de transientes de Ca^{2+}

O objetivo deste programa é auxiliar a análise de transientes de Ca^{2+} e/ou encurtamento de miócitos cardíacos isolados. Seu funcionamento é simples e intuitivo: ele importa os dados (encurtamento ou $[\text{Ca}^{2+}]_i$) no formato *.txt, que são gerados pelos programas de aquisição (Felix, Aqdados e LabView) utilizados em nosso laboratório. Para esta operação basta, como primeiro passo, ativar o botão abrir, presente na tela inicial do programa (Figura A.1).

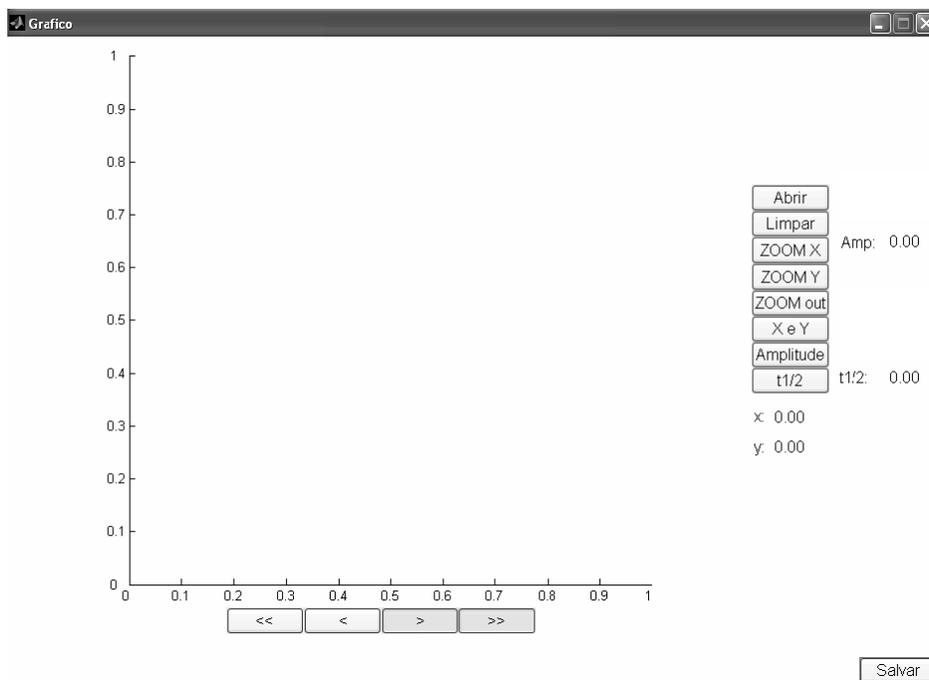


Figura A.1: Tela inicial do programa analisador de encurtamento e de transientes de Ca^{2+} .

O segundo passo é escolher o tipo de dado a ser analisado, cálcio ou encurtamento (Figura A.2). Esta escolha só influencia no modo em que se calcula o tempo para metade do decaimento ($t_{1/2}$).

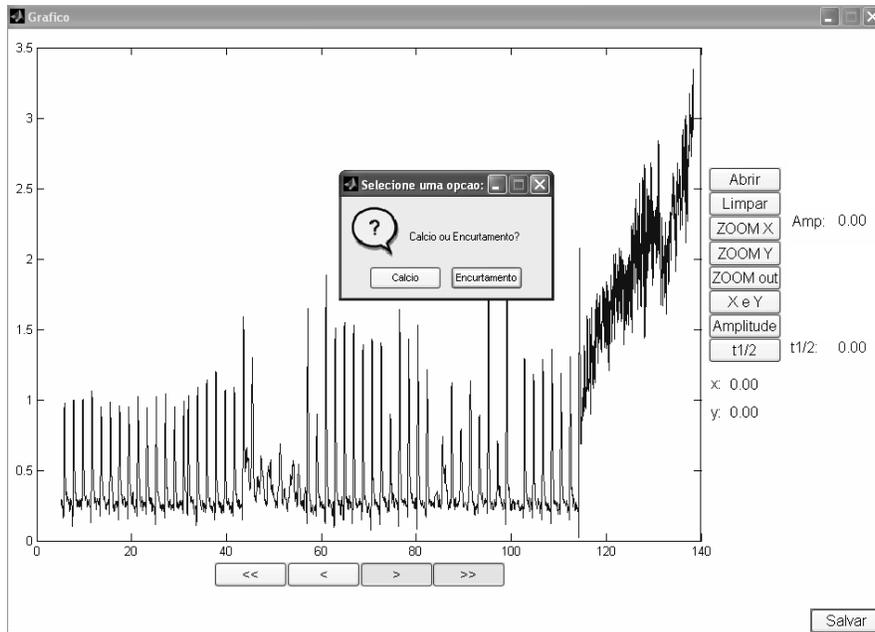


Figura A.2: Tela com o sinal aberto e a opção de escolha entre cálculo ou encurtamento.

Para facilitar a análise do sinal é necessário utilizar a ferramenta *zoom*, por meio das teclas ZOOMX E ZOOMY, que ajustam a escala das coordenadas x e y, respectivamente, com o auxílio do *mouse* (Figura A.3). As teclas > ou >> deslocam o sinal para a direita e as teclas < ou << deslocam o sinal para a esquerda. Para reverter o *zoom* basta ativar a tecla ZOOM out.

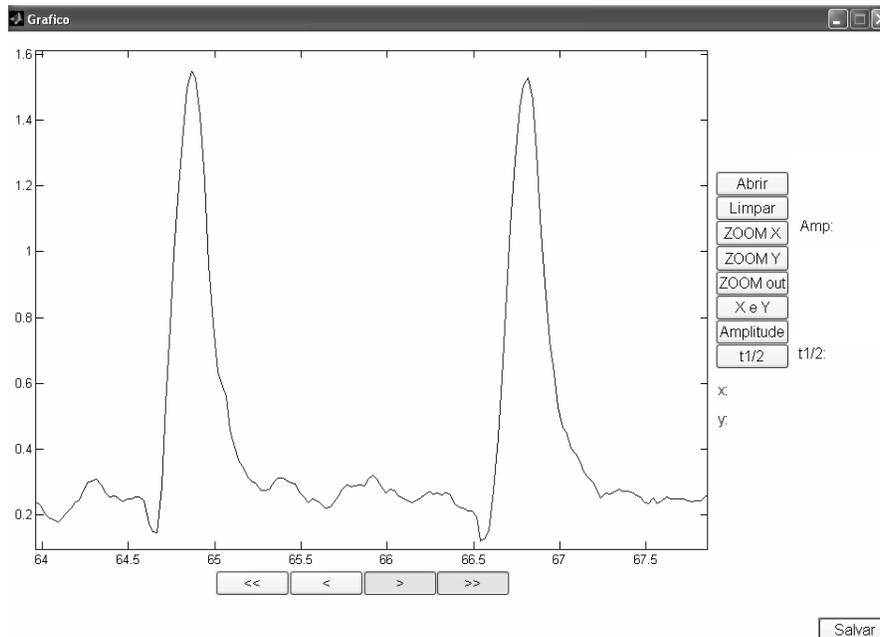


Figura A.3: Tela com o sinal após a utilização da ferramenta *zoom*.

A partir do momento em que o sinal de transiente de Ca^{2+} ou de encurtamento do miócito estiver bem visível na tela, podemos começar a análise. O botão X e Y mostra as coordenadas x e y (campo abaixo do botão “t_{1/2}”) do ponto selecionado pelo *mouse* (Figura A.4).

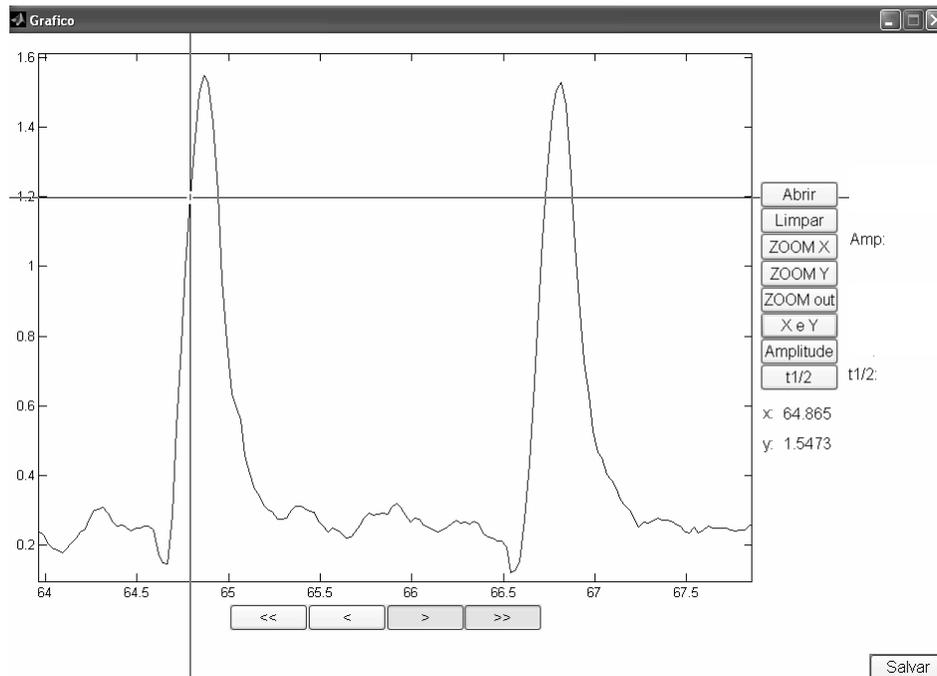


Figura A.4: Tela com os valores das coordenadas x e y do sinal. As linhas pretas indicam o alvo do próximo do ponto em que se deseja saber as coordenadas.

O botão “Amplitude” inicia o cálculo da amplitude do sinal analisado, selecionando 3 pontos: dois pontos obrigatoriamente são selecionados no nível basal do sinal, antes do pico (Figura A.5, pontos A e B), e o último ponto a ser selecionado é o pico (Figura A.5, ponto C). A amplitude é dada pelo pico menos a média do sinal entre os pontos A e B (Ca^{2+} ou contração diastólica). Logo após selecionar o ponto C, a amplitude é indicada do lado do botão ZOMMX.

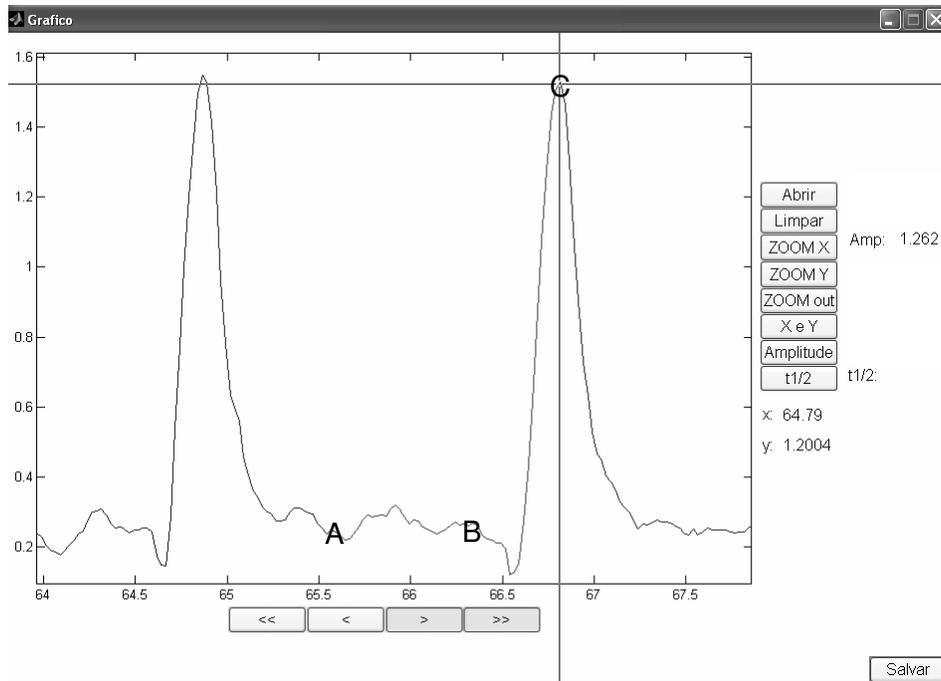


Figura A.5: Tela com o valor da amplitude (Amp) do sinal analisado. Os pontos A, B e C são os pontos selecionados, nesta ordem, para que ocorra a análise de modo correto.

O botão $t_{1/2}$ inicia o cálculo do tempo para queda de 50% selecionando 3 pontos: um ponto é o pico do sinal (Figura A.6, ponto A) e dois pontos obrigatoriamente são selecionados no nível basal do sinal, após o pico (Figura A.6, pontos B e C). Se o dado a ser analisado é o encurtamento, o $t_{1/2}$ é calculado da seguinte forma:

- 1- Amplitude do sinal é calculada

$$\text{Amplitude} = \text{pico} - \text{média do sinal entre os pontos A e B}$$

- 2- Amplitude dividida por dois é subtraída do pico

$$y' = \text{pico} - (\text{amplitude}/2)$$

- 3- O valor de $t_{1/2}$ é calculado por:

$$t_{1/2} = x' - x_p$$

onde x' é o tempo correspondente à y' e x_p , o tempo correspondente ao pico

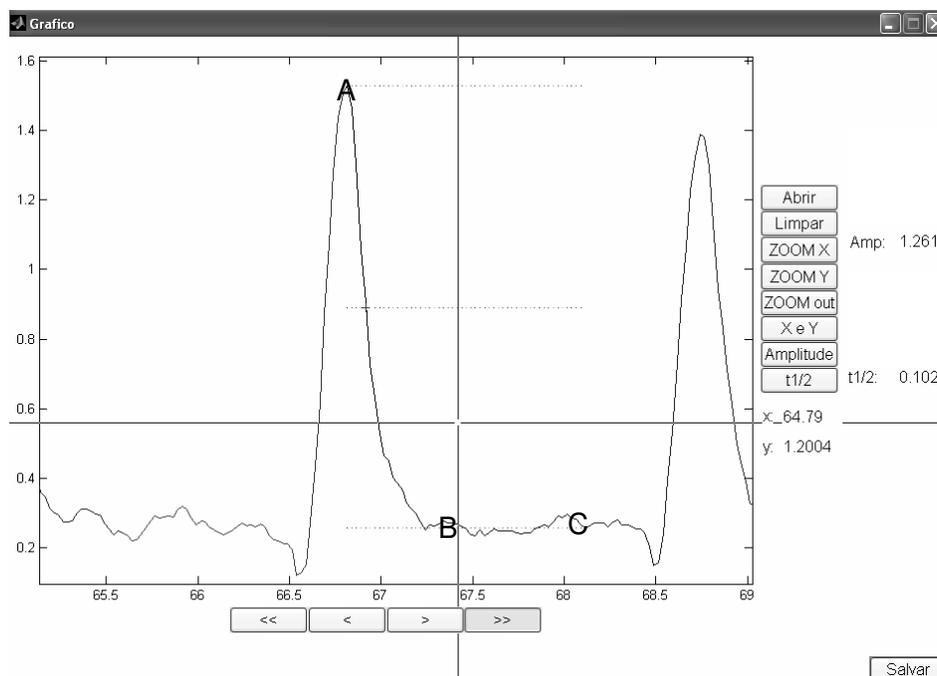


Figura A.6: Tela com o valor de $t_{1/2}$ do sinal de encurtamento analisado. Os pontos A, B e C são os pontos selecionados, nesta ordem, para que ocorra a análise de modo correto.

Se o dado a ser analisado é o transiente de Ca^{2+} , o sinal é selecionado da mesma forma que o item anterior. O $t_{1/2}$ é calculado do seguinte modo:

- 1- É feita uma regressão não linear do sinal selecionado, utilizando a seguinte equação:

$$y = \text{amplitude} \times \exp(-kx) + \text{média do sinal entre os pontos A e B}$$
- 2- Dessa regressão obtemos k e calculamos $t_{1/2}$:

$$t_{1/2} = 0,69/k$$

Por meio do botão Salvar, pode-se salvar os dados da análise (amplitude e $t_{1/2}$) do sinal analisado. Os dados são salvos na seqüência em foram executados em arquivo *.txt.

De modo geral este programa foi criado para diminuir o tempo de análise dos dados executada pelos outros programas (Felix ou Aqdados). O tempo de análise dos dados varia de usuário para usuário do programa, mas caiu no mínimo 50% em comparação com os outros programas existentes no laboratório.

A.1.2 Conversor de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$

O objetivo deste programa é converter o sinal de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$. O sinal de fluorescência é captado pelo programa *felix* e exportado no formato *.txt. O Conversor de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$ importa este sinal, utilizando-se a tecla Abrir (Figura A.7).

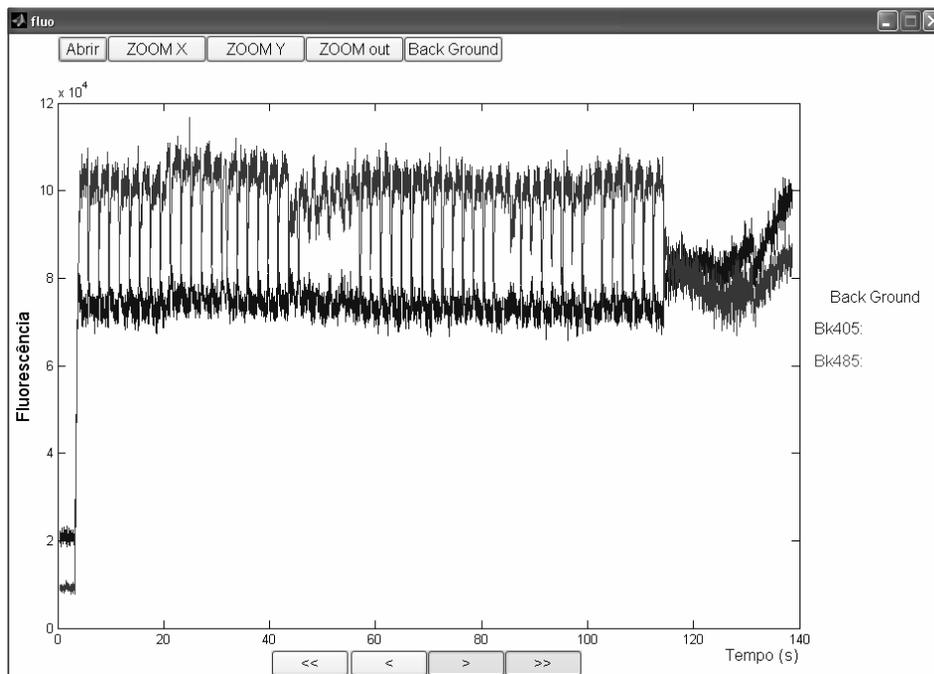


Figura A.7: Tela do programa conversor de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$ com os sinais de fluorescência, 405 nm e 485 nm abertos.

O próximo passo é digitar ou selecionar o intervalo do sinal correspondente ao *back-ground*. Isto é feito ativando a tecla *Back Ground* e escolhendo o modo de entrada do dado, que pode ser: “mouse” (para selecionar o intervalo no gráfico) ou “teclado” (para digitar o valor correspondente, Figura A.8). Uma vez selecionado ou digitado o *back-ground*, o sinal de razão de fluorescência calculado é mostrado em uma nova janela (F_{405}/F_{485} , Figura A.9):

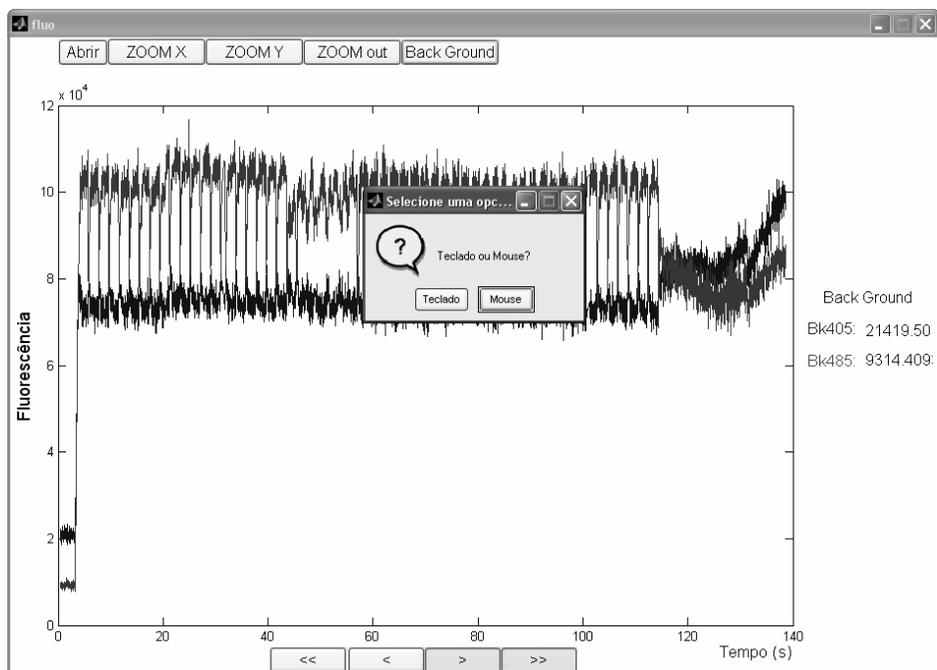


Figura A.8: Tela do programa com a opção de escolha do modo de entrada do valor de *back-ground*.

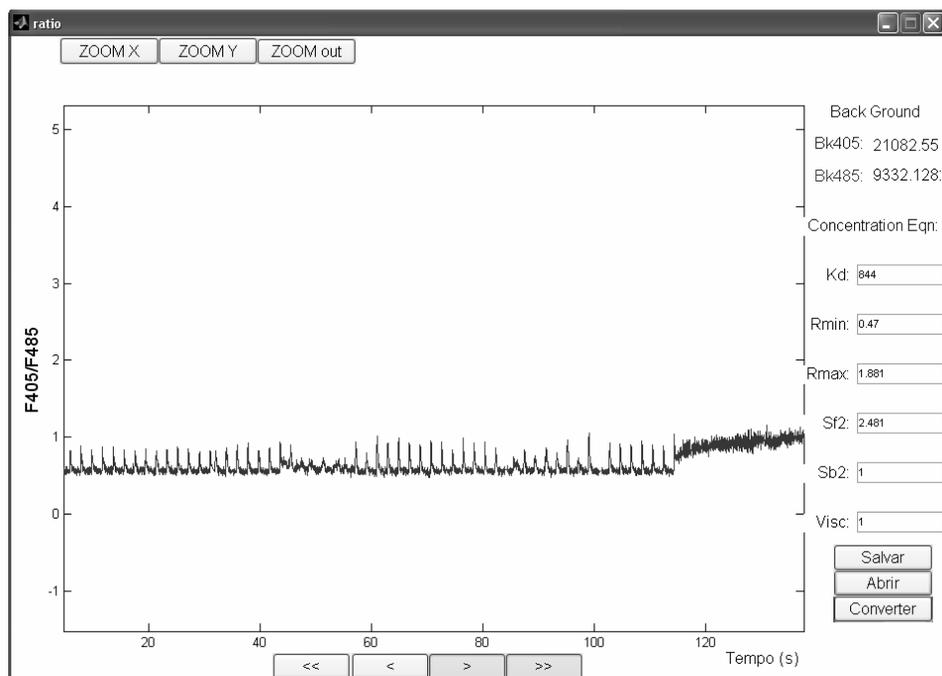


Figura A.9: Tela do programa com o a razão de fluorescência e os dados de calibração digitados.

Para que ocorra a conversão de razão de fluorescência para $[Ca^{2+}]_i$, temos que entrar com os parâmetros da calibração (Kd, Rmin, Rmax, Sf2, Sb2 e Visc) por meio do teclado ou por meio de um arquivo (escolhendo a opção Abrir; Figura A.9). A calibração

digitada pode ser salva ativando a tecla Salvar (Figura A.9). Uma vez digitada ou aberta a calibração basta ativar a tecla Converter para visualizar o gráfico de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura A.10).

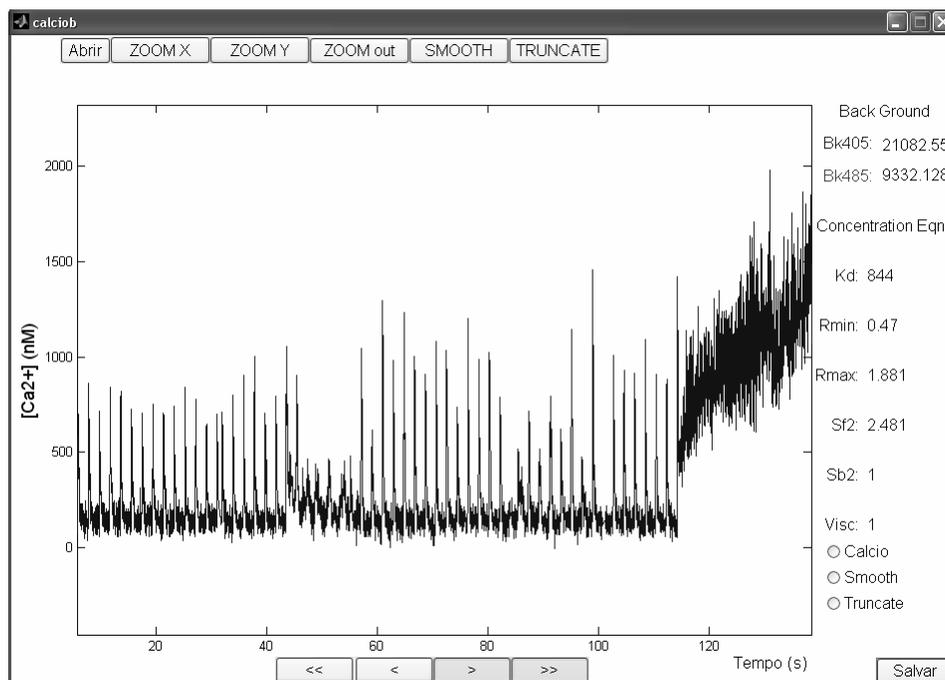


Figura A.10: Tela do programa com o sinal de Ca^{2+} , os valores de *back-ground* e os parâmetros de calibração.

Se ativarmos a tecla SMOOTH, podemos filtrar o sinal pelo algoritmo de Savitzky-Golay e, por meio da tecla TRUNCATE, podemos selecionar uma parte do sinal de Ca^{2+} (Figura A.10). As opções Cálcio, Smooth e Truncate (canto inferior direito da figura A.10), quando selecionadas, mostram os respectivos sinais na tela, se existirem. O sinal, incluindo o sinal filtrado e o sinal selecionado, podem ser salvos em um arquivo *.txt, que pode ser analisado pelo programa Analisador de encurtamento e de transientes de Ca^{2+} .

Este programa foi criado para diminuir o tempo de conversão para $[Ca^{2+}]_i$ executada pelo programa Felix. O tempo de conversão dos dados de fluorescência varia de usuário para usuário do programa, mas caiu no mínimo 80% em comparação com o necessário para esta conversão em outro programa.

A.1.3 Detector de borda de sinal de vídeo de arquivos *.avi.

Nos últimos anos os aparelhos gravadores de vídeo cassete deixaram de ser fabricados. Com isso, a aquisição dos dados de encurtamento pós-experimentos ficaram prejudicadas, uma vez que é dependente deste aparelho. Assim, tornou-se necessário a

conversão do sinal de vídeo analógico para um sinal de vídeo digital, por meio de placas de aquisição de vídeo. Utilizamos uma placa de aquisição (mod. Dazzle DVC150 USB, Pinnacle Systems, Pequim, China) que permite converter o sinal de vídeo analógico em arquivos *.mpg ou *.avi e vice-versa. Dessa forma podemos recuperar o sinal de vídeo analógico diretamente da placa e, portanto, recuperamos o sinal de encurtamento, ligando a placa diretamente no DBV.

Porém, como o sinal de vídeo já está na forma digital, desenvolvemos um programa que gera o sinal de encurtamento da célula cardíaca isolada a partir de um arquivo de vídeo (avi). Ativando o botão Abrir, abre-se o primeiro frame do sinal de vídeo, que pode ser trocado, digitando o número do frame e clicando em atualizar (Figura A.11).

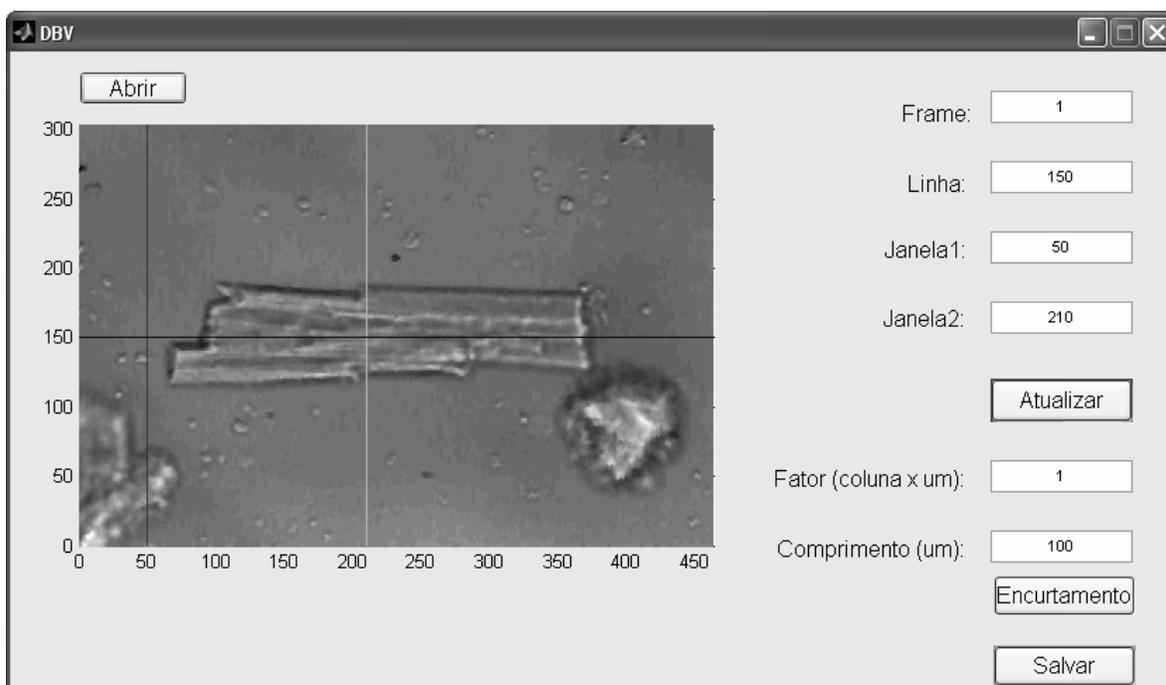


Figura A.11: Tela do programa com o primeiro frame do sinal de vídeo de um miócito cardíaco isolado aberto.

O próximo passo é escolher a linha (linha preta horizontal), o limite inferior (Janela1, linha preta vertical) e superior (Janela2, linha branca vertical) do sinal de encurtamento a ser analisado, e ativar o botão Atualizar (Figura A.11). A linha horizontal deve estar acima da borda preta da célula e os limites devem englobar o maior encurtamento da célula. O campo Fator (coluna x μm) corresponde a uma constante de correção, que converte o número da coluna do sinal de vídeo em comprimento (μm). Para

obter o sinal de encurtamento em porcentagem do comprimento de repouso, basta digitar o comprimento de repouso da célula, para obter em μm basta digitar 100 em vez do comprimento da célula.

Ao ativar a tecla Encurtamento, começa a análise do sinal de vídeo e o sinal de encurtamento será mostrado em uma nova janela (Figura A.12). O sinal pode ser salvo com extensão *.txt e pode ser analisado pelo programa Analisador de encurtamento e de transientes de Ca^{2+} .

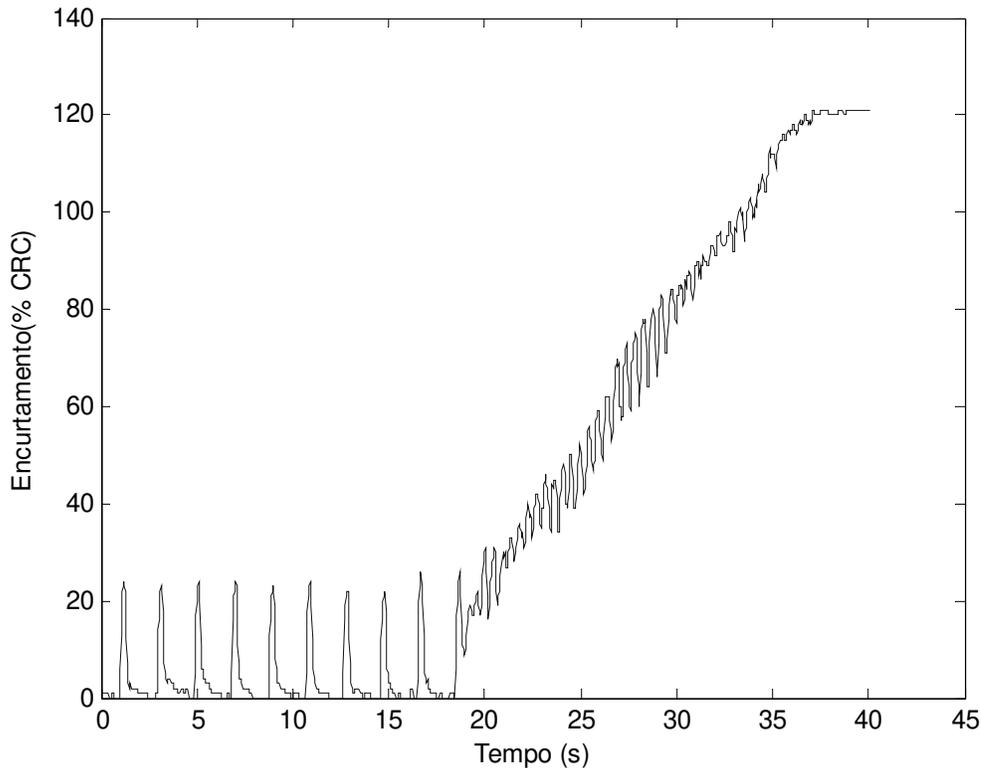


Figura A.12: Sinal de encurtamento gerado a partir de um arquivo digital de vídeo.

A.2 DETECTOR DE BORDA DE SINAL DE VÍDEO MICROCONTROLADO

O DBV utilizado neste trabalho é um aparelho totalmente analógico e, pelo menos a cada três meses, necessitava de calibração (são mais de dez *trim-pots* de calibração). Assim, desenvolvemos um novo DBV baseado em um microcontrolador (PIC-16F877A). O diagrama de blocos do DBV está ilustrado na Figura A.13. Seu funcionamento é bem simples. O sinal de vídeo passa pelo separador de sincronismo, que envia um sinal que indica quando a tela é iniciada e outro de quando cada linha é iniciada. O PIC escolhe a

linha e o intervalo de análise, inseridos pelo usuário. A linha e o intervalo são inseridos pelo PIC no sinal de vídeo por meio do somador e são visualizados na tela do monitor por meio de uma linha branca. A partir do início do intervalo de análise o PIC começa a contar o tempo até a detecção de uma borda preta, detectada pelo comparador, de acordo com o ajuste do usuário, esse tempo é proporcional à posição da borda preta e é transferido para o conversor analógico/digital (A/D). Portanto, o sinal da saída do conversor A/D é proporcional à posição da borda preta e, logo, ao encurtamento celular. Este sinal é amplificado e visualizado no osciloscópio.

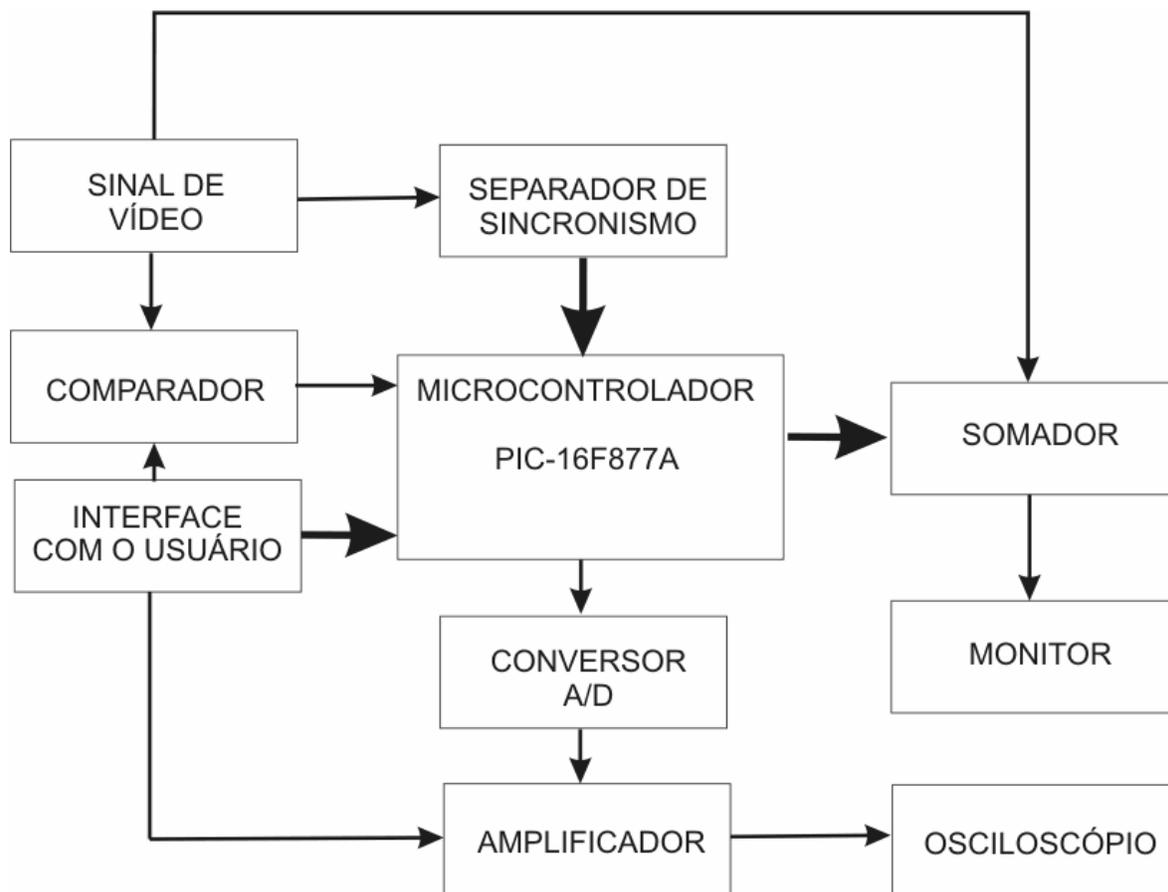


Figura A.13: Diagrama em blocos do detector de borda de sinal de vídeo microcontrolado.

Este DBV microcontrolado ficou três vezes menor que o DBV analógico e possui somente dois *trim-pots* de calibração. A interface com o usuário é bem simples, composta por 6 chaves, para escolher a linha, intervalo de análise e posição do intervalo, e dois potenciômetros, para ajustar o *off-set* do amplificador e o limiar de detecção da borda preta para o comparador.