

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE
COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

**Aplicação de Técnicas de Engenharia
no Estudo de
Células Cardíacas Isoladas:
Medição de $[Ca^{2+}]$ e Limiar de Estimulação**

Autor : **Paulo Alberto Paes Gomes**
Orientador: **José Wilson Magalhães Bassani**

Curso: Engenharia Elétrica
Área de concentração: Automação

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Campinas, 1997

S.P.-Brasil

9805484

| |
|--|
| Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por <u>Paulo Alberto Paes Gomes</u> e aprovada pela Comissão Julgada em <u>22 / 12 / 197</u> |
| <u>José Wilson Magalhães Bassani</u> Orientador |

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA: | UNICAMP |
| | G.5850 |
| V. | Ex. |
| TAMBO BC/ | 02931 |
| PROC. | 29.5/98 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 07/03/98 |
| N.º CPD | |

CM-00106510-4

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

G585a Gomes, Paulo Alberto Paes
Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: mediçã de $[Ca^{2+}]$ e limiar de estimulação / Paulo Alberto Paes Gomes.--Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Cálcio.* 2. Fluorescência.* 3. Estímulos elétricos.* 4. Células musculares.* 5. Miocárdio.* I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Dedicatória:

Dedico este trabalho às duas pessoas que mais me ensinaram sobre o mundo e sobre a vida: Dona Taninha, minha mãe e Gabi, minha filha, minha pérola.

Agradecimentos:

De coração, a todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Quero agradecer, por toda a colaboração e companherismo, aos funcionários e estagiários da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (CPD) do CEB e do DEB: Helô, Nirley, Eugênio, Mauro, Gilson, Toledo, Oswaldo, Alexandre, André, Karen e Fabiana.

Agradeço também aos outros funcionários do CEB, em especial ao Rogério e à Marcinha, por todas as sugestões e soluções criativas que tanto me ajudaram.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, com quem compartilhei angústias, alegrias e principalmente muitas noites de trabalho.

Duas pessoas se dedicaram de uma maneira fora de série a este projeto e foram decisivas para sua conclusão: à Rosana e ao Marcelo o meu maior apreço, gratidão e admiração.

Sobretudo quero agradecer ao Bassani, meu orientador, que além de me acolher como seu orientando em uma hora difícil, além de me apoiar e guiar a todo instante, se tornou um grande companheiro e amigo.

Durante os quatro primeiros anos de doutorado recebi uma **bolsa da CAPES**, recebi também um **auxílio ponte da FAEP** (Sol. n.: 0879/97) e no último mês de trabalho uma **bolsa D1 da FAPESP** (Proc. n.: 97/07537-5). Agradeço sinceramente a estas agências.

A felicidade não é uma conquista intelectual,

a felicidade é uma dádiva

que a vida pode ou não lhe conceder.

Você pode ou não estar pronto a recebê-la.

Sumário

| | |
|---|------------|
| 1 - Introdução | 1 |
| Primeira Parte: Desenvolvimento da Instrumentação | 22 |
| 2 - Bases Teóricas | 23 |
| 3 - O Sistema de Microscopia de Fluorescência | 46 |
| 4 - Testes de Bancada | 74 |
| 5 - Testes Biológicos | 87 |
| Resultados e discussão relativos à primeira parte. | 98 |
| Segunda Parte: Estudo de Células Cardíacas Isoladas | 108 |
| 6 - Estimulação por campo de miócitos cardíacos durante o desenvolvimento pós natal: Experimentação <i>versus</i> Modelo Teórico | 111 |
| 7 - Transiente de Ca^{2+} em miócitos cardíacos isolados de ratos durante o desenvolvimento pós-natal: Parâmetros de Calibração e Características dos Transientes. | 136 |
| Conclusões finais | 152 |
| Referências Bibliográficas | 156 |

Lista de Figuras

Capítulo 1

| | |
|--|----|
| fig 1.1 - desenho esquemático do coração. | 2 |
| fig 1.2 - esquema do potencial de ação cardíaco típico. | 4 |
| fig 1.3 - célula cardíaca de rato adulto como vista ao microscópio. | 6 |
| fig 1.4 - célula cardíaca de mamífero com suas estruturas principais. | 7 |
| fig 1.5 - desenho esquemático de um sarcômero e miofibrila | 10 |
| fig 1.6 - esquema dos fluxos do íon cálcio em um miócito cardíaco de mamífero. SL, sarcolema; I_{Ca} , corrente de Ca pelos canais da membrana; NaCaT, troca Na/Ca; SR retículo sarcoplasmático; MF, miofilamentos; MITO, mitocôndria. A ATPase de Ca da membrana está representada na face horizontal, indicada por transporte dependente de ATP. O uniporter mitocondrial está representado como uma via de transporte de Ca do citosol para o interior da mitocôndria (modificado de Bers,1991). | 15 |
| fig 1.7 - esquema simplificado do curso temporal de um transiente de Ca. | 16 |

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| fig 2.1 - Diagrama de Jablonski para uma molécula em solução. A primeira linha representa a absorção de um fóton levando o átomo do estado fundamental (S_0) ao segundo estado eletrônico excitado (S_2). Depois temos relaxação de S_2 a S_1 sem emissão de fóton. Representamos em seguida a relaxação de S_1 até dois dos possíveis níveis rotacionais e vibracionais do estado fundamental. Temos depois a absorção de um fóton levando a molécula de S_0 a S_1 , seguida de relaxação sem emissão. | 24 |
| fig 2.2 - Espectro de Emissão típico para molécula em solução, normalizado de modo que a integral da curva seja numericamente igual a Q. A probabilidade de emissão entre os comprimentos de onda λ e $\lambda+d\lambda$ é dada pela área da curva entre estes dois pontos. | 26 |

- fig 2.3** -Variação da intensidade de luz passando por uma amostra: ρ é a densidade de luz; A e δ são respectivamente a área e a espessura da amostra; I_i é a intensidade de luz incidente sobre ela e $I(x)$ é a intensidade de luz que chega a um plano à distância x da face da amostra. 27
- fig 2.4** - espectro do indicador indo-1 livre e ligado ao cálcio. 29
- fig 2.5** - Diagrama do Método da Razão. Os vetores I representam as intensidades de luz totais emitidas pela amostra. Os vetores F as intensidades medidas pelos fotosensores. 35
- fig 2.6** - Diagrama para um sistema com eficiência de transmissão diferente para os dois comprimentos de onda. Canal 1 = 33 % , Canal 2 = 50 % . 36
- fig 2.7** - Representação para sinal sem subtração correta do *background*. a) $\alpha_0 < \alpha_{bg}$ e $< \alpha_{sat}$ e b) $\alpha_0 > \alpha_{bg}$. 37
- fig 2.8** - Determinação de β a partir do Diagrama do Método da Razão. 39
- fig 2.9** - Curvas de sensibilidade para três valores diferentes de R_{min} / R_{max} . Observar que o máximo ocorre em valores de $[Ca]$ menores que $K_d \beta$. 41
- fig 2.10** $-\epsilon_{Ca}$ em função de R / R_{min} . Podemos ver que ϵ_{Ca} não é simétrico com relação ao sinal de ϵ_{min} 43

Capítulo 3

- fig 3.1** - bancada anti-vibração: 1- estrutura metálica; 2 - pedra de granito; 3 - dispositivo regulável com bolas de tênis; 4 - pés vibrastop; 5 - mesa com dispositivo de movimentação da objetiva. 47
- fig 3.2** - distribuição de potência para a lâmpada Halon-Tungstênio a 70W. 49
- fig 3.3** - óptica de excitação: 1- lâmpada; 2 - filtro calórico; 3 - dubleto condensador; 4 - lente; 5 - filtro de interferência $\lambda = 365nm$ em suporte removível; 6 - shutter rápido e íris manual; 7 - tampa traseira com espaçamento para passagem de ar; 8 - entrada de ar; 9 - espelho dicróico $\lambda = 385nm$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra. 51
- fig 3.4** - espectro de transmitância do filtro calórico. 53
- fig 3.5** - transmitância dos filtros de excitação:a) interferência b) absorção. 54
- fig 3.6** - espectro de transmitância a 45° do espelho dicróico de $\lambda_c = 390nm$. 54

| | |
|---|----|
| fig 3.7- óptica de monitoração: 9 - espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra ; 14 chave liga desliga; 15 - potenciômetro; 16 - LED com lente focalizadora; - 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho, RRM; 20 - câmera de T.V. tipo CCD. | 56 |
| fig 3.8- espectro de transmitância a 45° do espelho refletor de vermelho. | 57 |
| fig 3.9 - óptica de detecção: 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho RRM; 20 - câmera de T.V. tipo CCD; 21 - espelho dicróico $\lambda = 445 \text{ nm}$; 22 - PMT com filtro $\lambda = 405$; 23 - PMT com filtro $\lambda = 485$. | 59 |
| fig 3.10 - espectro de transmitância a 45° para o dicróico $\lambda_c = 450\text{nm}$. | 60 |
| fig 3.11- espectro de transmitância do filtro de interferência $\lambda = 410 \text{ nm}$. | 60 |
| fig 3.12 - espectro de transmitância do filtro de interferência $\lambda = 495 \text{ nm}$. | 60 |
| fig 3.13 - vista global do sistema óptico: 1- lâmpada; 2 - filtro calórico; 3 - dubleto condensador; 4 - lente; 5 - filtro de interferência $\lambda = 365\text{nm}$ em suporte removível; 6 - shutter rápido e íris manual; 7 - tampa traseira com espaçamento para passagem de ar; 8 - entrada de ar; 9 - espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra. 14 - chave liga-desliga; 15 - potenciômetro; 16 - LED com lente focalizadora; - 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho; 20 - câmera de T.V. tipo CCD; 21 - espelho dicróico $\lambda = 445 \text{ nm}$; 22 - PMT com filtro $\lambda = 405$; 23 - PMT com filtro $\lambda = 485$. | 61 |
| fig 3.14 - tubo foto multiplicador (PMT) tipo <i>side-on</i> e fotocatodo de reflexão. | 62 |
| fig 3.15 - resposta espectral da PMT modelo R4220. | 64 |
| fig 3.16 - esquema de alimentação da PMT. | 66 |
| fig 3.17 - circuito do conversor corrente / tensão. | 66 |
| fig 3.18 -circuito eletrônico associado às PMT's. | 67 |
| fig 3.19 - R medido durante um transiente típico estimulado po campo. | 68 |
| fig 3.20 - transformada de fourrier do transiente mostrado na fig.3.9. | 68 |
| fig 3.21 - curva de resposta de frequência para os filtros Butterworth. | 69 |
| fig 3.22 - diagrama de blocos do circuito divisor de sinais. | 71 |
| fig 3.23 - circuito logarítmico: $V_{out} = \ln V_{in}$. | 71 |
| fig 3.24 - circuito antilog: $V_{out} = e^{V_{in}}$. | 72 |

Capítulo 4

- fig 4.1** - geometria da montagem para medição da intensidade de luz de excitação. 77
- fig 4.2** - intensidade de luz ultra-violeta em função da potência da lâmpada. 77
- fig 4.3**- razão para diferentes intensidades de luz de excitação. 78
- fig 4.4** - curvas de transmitância dos filtros de densidade. Valores de transmitâncias nominais a) e b) 50 % para ambos; c) 12% e d) 3 %. 79
- fig 4.5** - sinal de saída para diversas combinações de filtros de densidade. a) - canal 1 (azul) e b) - canal 2 (verde). Ambos os sinais filtrados eletronicamente com filtro passa baixa em 50Hz . 80
- fig 4.6** - curvas mostrando a linearidade do sistema de detecção com relação à luz incidente. 82
- fig 4.7**- teste do alinhamento do sistema: canal verde.a) registro da intensidade de luz medida no canal 2 quando a posição da esfera fluorescente é modificada. b) esquema das posições da esfera. 84
- fig 4.8** - razão versus abertura da fenda com água tônica como amostra. a) fenda superior; b) fenda inferior. 86

Capítulo 5

- fig 5.1** - desenho esquemático do Sistema de Isolação de Células: 1 e 2 cubas para as diferentes soluções; 3 cuba para recolhimento da solução após a perfusão; 4 Becker para recirculação. 89
- fig 5.2** - sinal registrado (V) em cada um dos canais durante o carregamento: 1- autofluorescência da célula; 2- sinal de fundo, sem a célula na janela; 3- fluorescência da célula com indo-1, 20 min após carregamento; 4 - sinal de fundo com solução contendo indo-1 AM ; 5 - fluorescência da célula carregada em repouso, após lavagem do indicador não deesterificado; 6- sinal de fundo, sem a célula na janela. 92
- fig 5.3** - fluorescências medidas nos canais 1 e 2 (registros do meio e inferior) e razão entre elas (registros superior). Taxa de aquisição 1000Hz e filtragem eletrônica em 25Hz. Estimulação elétrica da célula em ~ 0.6 Hz. 93
- fig 5.4** - razão com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz substituindo cada 20 pontos pela média. 94

| | |
|---|----|
| fig 5.5 - razão com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz e alisamento com 6 vizinhos (smth7). | 95 |
| fig 5.6 - razão com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz e alisamento com 14 vizinhos (smth15). | 95 |
| fig 5.7 - transientes pós pausa da estimulação de 15s. | 96 |
| fig 5.8 - transiente induzido por aplicação rápida de cafeína. | 97 |

Capítulo 6

| | |
|--|-----|
| fig. 6.1 - Casca esférica dielétrica de diâmetro a em meio condutor infinito com $\mathbf{E} = E_0 \mathbf{z}$ para $2r \gg a$. São mostradas as linhas de campo \mathbf{E} . | 113 |
| fig 6.2 - A e C em função de c/a , onde c e a são os comprimentos dos semi-eixos maior e menor da célula, respectivamente. | 117 |
| fig 6.3 - câmara de perfusão. | 120 |
| fig 6.4 - vista lateral da câmara de perfusão, mostrando a posição dos eletrodos e nível da solução fisiológica. O campo elétrico no centro da câmara pode ser aproximado pela equação apresentada na parte inferior da figura. | 121 |
| fig 6.5 - Geometria das células estimuladas. Animais: ratos de 5 a 180 dias de idade. Fatores geométricos: Eixo maior ($2c$), eixo menor ($2a$) e razão entre os eixos (c/a). Para as duas primeiras variáveis, estão apresentadas as medianas e as linhas indicam o limite do percentil para 75%. Para c/a (que apresentou distribuição normal), as barras representam as médias, e as linhas, os erros-padrões. | 125 |
| fig. 6.6 - Médias do campo limiar (E_L) obtido para as células de ratos de diversas idades (de 5 a 180 dias). As linhas verticais indicam os limites superiores dos intervalos de confiança para 95%. | 126 |
| fig. 6.7 - medianas dos valores de V_L calculados para células de ratos de diversas idades (entre 5 e 180 dias), a partir da geometria de cada célula, da intensidade e da direção do campo aplicado. As linhas verticais indicam os percentis para 75%. | 127 |
| fig. 6.8 - comparação do campo limiar (E_L) longitudinal (paralelo a c) e transversal (perpendicular a c) para células de ratos de diversas idades. | 129 |
| fig 6.9 a) limiar <i>versus</i> Cc para campo longitudinal e b) limiar <i>versus</i> Aa para campo transversal. | 130 |

Capítulo 7

- fig 7.1** - média dos valores de R_{\max} , β e R_{\min} para os quatro grupos. 141
- fig. 7.2a-d** - transiente de cálcio em célula de rato de 5, 14, 30 dias e adultos. As setas indicam os instantes da aplicação dos estímulos. 145 e 146
- fig 7.3** - transientes obtidos a partir dos dados da fig 7.4a e d, após promediação. 147
- fig 7.4** - características dos transientes de cálcio para células de ratos de diferentes idades. 148

Lista de Tabelas

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Tabela 4.1 - Dados de transmitância obtidos para os canais azul e verde. | 81 |
| Tabela 4.2 - resultados da regressão linear. | 81 |

Capítulo 5

| | |
|--|----|
| Tabela 5.1 - Fluorescências antes, durante e depois do processo de loading. | 92 |
|--|----|

Capítulo 6

| | |
|---|-----|
| Tabela 6.1 - resumo dos resultados das 3 figuras acima. | 127 |
| Tabela 6.2 - Limiar de estimulação com campo longitudinal e transversal. | 128 |

Capítulo 7

| | |
|--|-----|
| Tabela 7.1 - média e erro padrão de R_{\min} , β e R_{\max} para as diversas idades. Entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95% . | 143 |
| Tabela 7.2 - características dos transientes de cálcio para células de animais das diversas idades. | 148 |

Nomenclatura

Letras Latinas

a - inclinação da reta

b - ponto onde a reta cruza o eixo dos y

c - concentração

d - espaçamento entre lentes de um dubleto

f - distância focal

s - distâncias relativas a lentes ópticas

x - distância

y - eixo coordenado

A - área

B_G - intensidade de luz de fundo (*background*)

\mathbf{B}_G - vetor intensidade de luz de fundo (*background*)

[Ca] - concentração de cálcio

F - intensidade de luz medida

\mathbf{F} - vetor intensidade de luz medida

I - intensidade de luz

\mathbf{I} - vetor intensidade de luz emitida

I - corrente (circuito das PMT's)

K_d - constante de dissociação

M - magnificação

$P(\lambda)d\lambda$ - probabilidade de emissão entre λ e $\lambda+d\lambda$

Q - quantum yield, eficiência quântica

QE - eficiência quântica das PMT's

\mathcal{R} - razão entre intensidades de luz emitidas

R - razão entre intensidades de luz medidas

R - resistência elétrica

S - sensibilidade radiante das PMT's

S - constante de proporcionalidade entre intensidade de luz emitida e concentração

S1 , S2 - estados eletrônicos de um átomo ou molécula

S - função sensibilidade

V - tensão

V_m - potencial de membrana

Y - eficiência óptica

Potências

M - mega (10^6)

k - kilo (10^3)

m - mili (10^{-3})

μ - micro (10^{-6})

n - nano (10^{-9})

Unidades

A - ampere

V - volts

W - watts

Ω - ohm

Hz - hertz

s - segundo

Mol - molar (moles por litro)

Letras Gregas

α - ângulo

β - constante de calibração da equação fundamental do método da razão

δ - espessura

ε - coeficiente de extinção

λ - comprimento de onda

π - pi

ρ - densidade de luz

Subscritos

ab - absorvida

b - ligado

c - crítico

f - livre

i - incidente

iso - isobéptico

in - entrada

out - saída

sat - saturado

t - total

0 - zero

Siglas

AEC - Acoplamento excitação-contração

BK7 - tipo de vidro

CCD - sensor de luz (*charge couple device*).

FET - transistor de efeito de campo (*field effect transistor*).

HV - alta tensão (*high voltage*).

LED - diodo emissor de luz (*light emitting diode*).

NAV - Nódulo átrio ventricular

NSA - Nódulo sinu atrial

PA - potencial de ação

PMT - tubo fotomultiplicador (*photomultiplier tube*).

RRM - espelho refletor de vermelho (*red reflective mirror*).

RS - retículo sarcoplasmático

SS - estado estacionário (*steady state*).

UV - ultravioleta.

w.d. - distância de trabalho (*working distance*).

Resumo

GOMES, Paulo Alberto Paes, *Aplicação de Técnicas de Engenharia no Estudo de Células Cardíacas Isoladas: Medição de $[Ca^{2+}]_i$ e Limiar de Estimulação*, Campinas,: Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 155 p. Tese (Doutorado)

Vários eventos fisiológicos importantes são governados por variações na concentração intracelular de cálcio, $[Ca^{2+}]_i$. Na célula cardíaca, variações na $[Ca^{2+}]_i$ são responsáveis pelo disparo e controle da força e curso temporal da contração. Neste trabalho estudamos a teoria que fundamenta o uso do Método da Razão, na quantificação de $[Ca^{2+}]_i$, a partir da medição de fluorescência emitida por indicadores como indo-1 e fura-2. Um sistema de microscopia de fluorescência completo, para ser utilizado com o indo-1, foi projetado e construído. O sistema foi utilizado no estudo dos transientes de cálcio em miócitos cardíacos isolados de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (idades: 3 - 6; 13 - 16; 28 - 35 e 180 dias). Apesar dos parâmetros de calibração não se manterem constantes nos diversos grupos, as características dos transientes não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($[Ca^{2+}]_i$ diastólico $\sim 180\text{nM}$; $[Ca^{2+}]_i$ pico $\sim 1\mu\text{M}$ e fwhm $\sim 0.35\text{ms}$). Estudando o limiar de estimulação elétrica pudemos comprovar experimentalmente que ele diminui com o desenvolvimento do animal, devido à modificação da geometria das células, como previsto pela teoria.

Palavras Chave - Cálcio, Fluorescência, Método da Razão, Miócito Cardíaco, Estimulação por Campo.

Abstract

GOMES, Paulo Alberto Paes, *Application of Engeneering Techniques to Study Isolated Cardiac Myocytes: Measuring $[Ca^{2+}]_i$ and Stimulation Threshold*, Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 120 p. Tese (Doutorado)

Important physiological events are governed by changes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$). In cardiac cells, $[Ca^{2+}]_i$ changes are responsible for triggering and controlling the strength and timecourse of contractions. In this work, we studied the fundamental theory for the ratio method, a method to quantitate $[Ca^{2+}]_i$ from the ratio of fluorescence emitted by a ratiometric Ca^{2+} indicator, such as indo-1 and fura-2. Additionally, a complete microscopic system for measuring indo-1 fluorescence was designed and constructed. This system was applied for measuring Ca^{2+} transients in cardiac myocytes isolated from rats during post-natal development (ages: 3-6; 13-16; 28-35 and 180 days). Although the calibration parameters were not the same for all ages, diastolic and peak $[Ca^{2+}]_i$ and duration of the Ca^{2+} transients were not significantly different (~ 180 nM, $1\mu M$ and 0.35 s, respectively). To explain the field stimulation process of the cells at different ages we developed a simple model based on the eletromagnetic theory. Measured threshold for field eletrical stimulation was age-dependent and was found to be related to the cell geometry, as predicted by the model.

Keywords: calcium, fluorescence, ratio method, cardiac myocytes, field eletric stimulation.

Capítulo 1

Introdução

O íon cálcio (Ca^{2+}) desempenha diversas funções nas células de organismos vivos, sendo o mensageiro intracelular de vários agentes externos (Bers, 1991). Dentre os inúmeros processos nos quais Ca^{2+} participa podemos citar: divisão celular, expressão genética, liberação de neurotransmissores, atividade elétrica em células excitáveis, respiração celular e contração em músculo esquelético, cardíaco e liso.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv), Departamento de Engenharia Biomédica (DEB), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) e Centro de Engenharia Biomédica (CEB), UNICAMP, onde o tema central de estudo é o coração. Assim, dentre todas as funções do íon cálcio, estamos especialmente interessados naquelas relacionadas à atividade contrátil deste órgão pois, para compreendermos o seu funcionamento, é fundamental conhecer a dinâmica das variações da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) durante a atividade celular. Além disso, várias doenças são consequências de disfunções de um ou mais mecanismos de transporte de Ca^{2+} (Gómez et al., 1997) e várias intervenções terapêuticas atuam diretamente sobre estes mecanismos. O estudo

das variações de $[Ca^{2+}]_i$ está, portanto, fortemente ligado ao desenvolvimento dos métodos de tratamento da doença cardíaca.

O coração é um órgão muscular cuja função principal é bombear o sangue pelos vasos, de modo que um suprimento adequado de nutrientes, hormônios, calor e oxigênio seja distribuído, pelo sistema circulatório, a todas as células do organismo. A circulação, promovida pela ação bombeadora do coração, se encarrega ainda de transportar para os órgãos de excreção os produtos do catabolismo celular, e para a pele, o calor a ser dissipado. Assim, o sistema cardiovascular é uma grande via de transporte no organismo, e o coração, o principal elemento ativo deste sistema.

A bomba cardíaca é formada basicamente por quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, separadas por septos. Entre átrios e ventrículos encontram-se válvulas que se abrem e fecham de acordo com o gradiente de pressão entre seus dois lados (fig. 1.1).

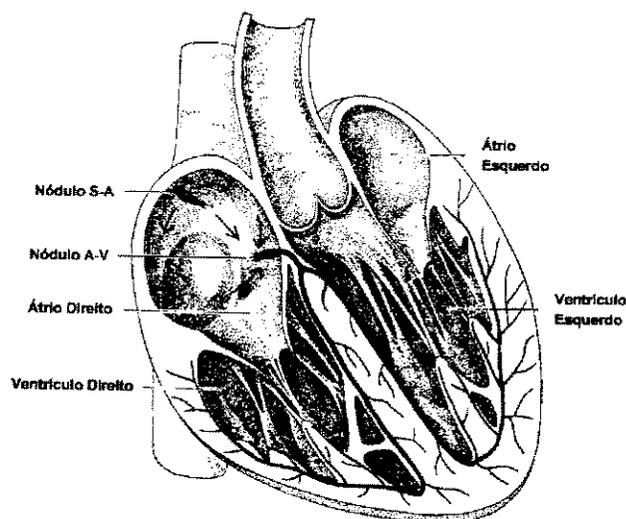


fig 1.1 - desenho esquemático do coração.

A ação bombeadora do coração depende da contração rítmica e coordenada dos átrios e ventrículos e do funcionamento adequado das válvulas. A habilidade de se contrair ritmicamente é uma propriedade intrínseca do coração. O órgão pode ser completamente isolado do organismo e continuar "batendo" por períodos indefinidos, desde que os nutrientes apropriados sejam supridos. Já em 1628 William Harvey demonstrou que o coração isolado podia ser cortado em vários pedaços e cada um continuaria a se contrair ritmicamente.

A atividade contrátil do coração é iniciada por uma onda de ativação elétrica que, como em outras células excitáveis, constitui-se em variação rápida do potencial de membrana (V_m) a partir do valor de repouso (condição polarizada em ~ -85 mV) até níveis acima de zero mV, decaindo posteriormente, de modo característico, aos níveis basais. Esta variação característica do potencial de membrana é denominada de potencial de ação (PA).

O PA cardíaco (fig. 1.2) difere substancialmente daquele observado no nervo ou no músculo esquelético, e sua forma varia também nas diversas regiões da musculatura cardíaca. No tecido de trabalho (músculos atrial e ventricular) do coração, o PA inclui todas as particularidades típicas do PA cardíaco. Uma despolarização inicial, rápida, com reversão de potencial (como observado nos outros tipos celulares) é seguida por um declínio inicialmente rápido para próximo de zero, valor este que é mantido por 200 a 300 ms antes que ocorra a repolarização para o valor de repouso. Pode-se distinguir uma fase inicial (fase 0) de aumento de condutância iônica e variação rápida do potencial. A seguir, observa-se uma fase de queda (retorno ao zero) rápida de V_m (fase 1), seguida de um platô em torno de zero mV (fase 2), durante o qual a impedância da célula volta aos seus níveis de repouso.

Após o platô, segue-se uma fase de queda abrupta de V_m (fase 3) para o nível de repouso, sucedida pela chamada fase "diastólica" (fase 4) do potencial de ação, que irá durar até a ocorrência de novo PA. No chamado marcapasso natural do coração, o PA não apresenta platô, sendo portanto ausente a fase 2.

Uma vez disparado, o PA se propaga de uma extremidade a outra em uma célula, por meio de acoplamento espacial de corrente elétrica (teoria dos circuitos locais para a propagação do potencial de ação, Aidley, 1989). O músculo cardíaco é composto de células independentes, mas interconectadas por estruturas juncionais altamente sofisticadas nos chamados discos intercalados, onde em geral se encontram conexões especializadas, de baixa resistência, os chamados *gap junctions* (Spray & Burt, 1990). Assim, pelo mesmo princípio de acoplamento espacial de corrente, um PA originado em uma célula pode se propagar rapidamente por todo o miocárdio.

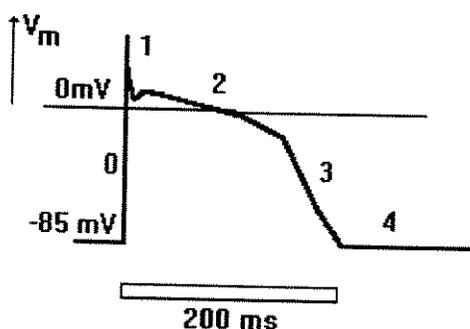


fig 1.2 esquema de um potencial de ação cardíaco típico.

No coração normal, o nódulo sinusal (NSA) constitui o marcapasso natural primário. Trata-se de uma coleção de células especializadas, localizada no átrio direito, próximo à entrada da veia cava superior. Os PA são iniciados

espontaneamente nestas células e se espalham por todo o coração. Neurônios simpáticos e parassimpáticos inervam esta região e podem modular a descarga dos PA pelo NSA, controlando assim a frequência cardíaca.

Os PAs são então conduzidos através dos átrios (fig 1.1) com velocidade típica de 1m/s. A ativação atinge a única ponte de ligação elétrica entre átrios e ventrículos, o nódulo átrio-ventricular (NAV). Neste local, a condução dos PAs é reduzida drasticamente (velocidade cai a 0,05 a 0,1 m/s). De fato, um atraso de 70-80 ms é introduzido, permitindo a completa contração atrial antes que se inicie a contração ventricular. Após a passagem pelo NAV, a atividade elétrica atinge o feixe de His e os seus ramos esquerdo e direito. PAs são rapidamente conduzidos para as células ventriculares pelo sistema especializado de condução de His-Purkinje (velocidade 2 m/s). Finalmente, nos ventrículos, a ativação propaga-se para todas as células (velocidade de 1 m/s). O processo de ativação ventricular dura cerca de 0.3 s e constitui-se no disparador da atividade contrátil, fase do ciclo de ativação do coração (ciclo cardíaco) que se denomina sístole (contração).

Acredita-se que o tempo que as células levam para repolarização dependa da pressão, temperatura e outros fatores. De modo geral, parece que a repolarização não é sincronizada célula-a-célula, como acontece na despolarização. Durante a repolarização, inicia-se o período de relaxamento ou diástole, que termina com o início de outro ciclo de ativação elétrica e contração das células.

Para que o bombeamento seja otimizado, a musculatura em torno de cada cavidade contrai-se a seu tempo, fazendo um movimento ordenado e aumentando a eficiência de trabalho. Na verdade, mesmo em uma única câmara, as células cardíacas não se contraem simultaneamente. No ventrículo esquerdo, por exemplo, a contração

começa no ápice do coração, progredindo para a base, sincronizadamente, de modo que este músculo realize um movimento de ordenha e consiga aparentemente bombear o sangue com maior eficiência. Assim, para que uma célula possa se contrair em um dado instante, cada célula do coração deve ser capaz de exercer atividade contrátil. Deste modo, cada célula é equipada com o seu próprio aparato contrátil e sistema para seu controle. O conjunto de eventos desde a ativação elétrica das células até o desencadeamento da atividade contrátil é denominado de acoplamento excitação- contração (AEC).

1.1 - Estruturas celulares envolvidas no AEC

O miócito cardíaco de mamíferos adultos tem a forma aproximada de um paralelepípedo, com ângulos definidos, sendo que, no rato adulto, o comprimento é da ordem de 100 a 150 μm , a largura de 20 a 40 μm e a profundidade em torno de 10 μm (fig 1.3).

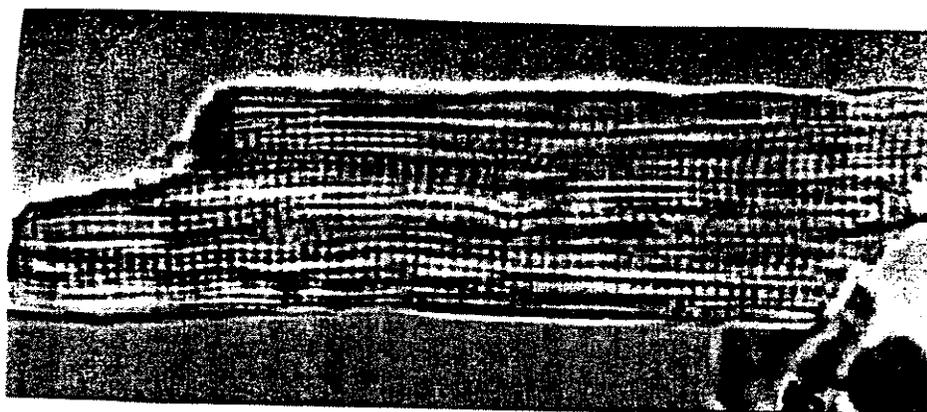


fig 1.3 - célula cardíaca de rato adulto como vista ao microscópio.

Ao longo do desenvolvimento pós-natal, contudo, estas dimensões e muitas estruturas básicas são marcadamente diferentes (Nakanishi et al.,1988), e isto pode ter reflexos importantes na função celular, em especial no processo de AEC. Embora muitas diferenças estruturais e funcionais possam ser identificadas, a maioria das estruturas básicas está presente, em maior ou menor grau de expressão, nas diversas fases do desenvolvimento ontogenético. A seguir, vamos descrever as estruturas celulares básicas envolvidas no AEC do miócito cardíaco de mamífero adulto.

Na figura 1.4 está ilustrado um esquema da célula cardíaca com as estruturas que estão mais diretamente ligadas ao AEC.

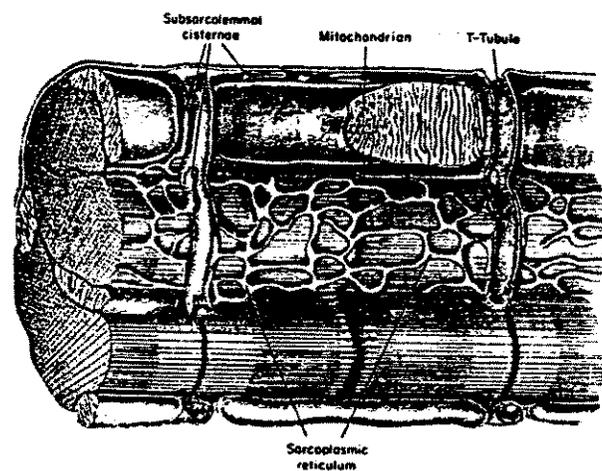


fig 1.4 - Célula cardíaca de mamífero com suas estruturas principais. Podemos ver as miofibrilas, o retículo sarcoplasmático, as mitocôndrias, sarcolema e túbulos T (modificado de Fawcett & McNutt,1969)

Sarcolema e túbulos transversos

A membrana celular, ou sarcolema, é uma estrutura formada por uma bicamada de fosfolípidos que aparentemente tem, como função principal, criar uma barreira de difusão entre o citosol e o meio externo. Distribuídas pela membrana, há diversas proteínas responsáveis pelo transporte de íons (por meio de canais, trocadores e bombas), entre eles o íon cálcio. É também a membrana a sede da atividade elétrica da célula, onde o PA, evento que dispara o acoplamento excitação-contracção, se origina e se propaga. O sarcolema é contínuo nos túbulos T, que se constituem em invaginações da membrana, permitindo que a interface entre os meios extra e intracelular não seja restrita à superfície da célula, mas também ocorra em seu interior. Em certos pontos do sarcolema, predominantemente nos túbulos T, este faz contato estreito com vesículas do retículo sarcoplasmático (principal sítio de estoque intracelular de Ca^{2+}). Estas regiões de contato são conhecidas como junções diádicas e são sítios críticos na iniciação do processo de AEC.

Retículo Sarcoplasmático (RS)

O retículo sarcoplasmático (RS) é um compartimento intracelular delimitado por membrana, mas não contíguo ao sarcolema. O RS constitui-se na principal fonte de Ca^{2+} para a contracção do músculo cardíaco. O íon é compartimentalizado no RS por meio de bombeamento ativo feito por uma ATPase de Ca^{2+} e ligação parcial, no interior da organela, à proteína calsequestrina (Campbel et al., 1983). Em *steady-state*, a quantidade total de Ca^{2+} armazenada no RS é cerca de duas vezes aquela liberada pela organela em uma contracção eletricamente estimulada (Bassani et al., 1993a). O percentual do volume celular ocupado pelo RS depende da espécie e idade

do animal e aparentemente determina a importância desta organela no processo de contração (Bers, 1991).

As junções do RS com o sarcolema se fazem por estruturas altamente especializadas, formando pontes entre as membranas do RS e plasmática, os chamados pés, *foot process*, que aparentemente seriam parte dos canais de liberação de cálcio do RS, também conhecidos por receptores de rianodina por sua alta afinidade de ligação com este alcalóide (Meissner, 1986).

Mitocôndria

Do volume total dos miócitos ventriculares de mamíferos, aproximadamente 35% são ocupados por mitocôndrias, que se distribuem de forma paralela aos miofilamentos, por toda a célula. A mitocôndria é a sede do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos e da fosforilação oxidativa (respiração celular com produção de ATP). O grande volume ocupado por estas organelas no miócito cardíaco indica uma alta demanda de energia por parte destas células (Bers, 1991).

A membrana mitocondrial interna é o local de controle de transporte de metabólitos e íons (e.g. Ca^{2+}). A área superficial de membrana mitocondrial é extremamente grande (mais de 10 vezes a área total de RS mais sarcolema), de modo que, em princípio, um pequeno transporte de Ca^{2+} por esta organela pode afetar o balanço total do íon nas células.

Sarcômero

Os sarcômeros são as unidades contráteis fundamentais. Eles correspondem à estrutura protéica limitada por duas linhas Z (fig. 1.5). Os sarcômeros são formados por miofilamentos grossos, compostos principalmente por miosina, e finos, compostos principalmente por actina, mas contendo também troponinas e tropomiosina. A partir das linhas Z, miofilamentos finos a elas ancorados projetam-se em direção ao centro do sarcômero. Os filamentos grossos, com cerca de $1.6 \mu\text{m}$ de comprimento, são centrados na linha M, onde são conectados uns aos outros em arranjo hexagonal por ligações radiais.

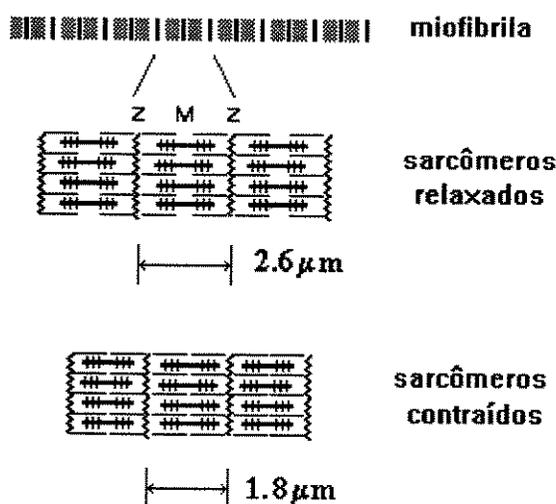


fig 1.5 - desenho esquemático de um sarcômero e miofibrila.

Cada cadeia de miosina tem uma cauda helicoidal longa e uma cabeça globular. As caudas do conjunto de moléculas de miosina formam o eixo principal do filamento grosso. As cabeças, que contêm sítios de ligação e hidrólise de ATP, formam as pontes cruzadas, que projetam-se para fora do filamento e interagem com o filamento fino. A máquina contrátil elementar da célula muscular é o sarcômero, que

se constitui no efetor final responsável pela transdução de energia química em energia mecânica e trabalho (Bers, 1991). Chamamos de miofibrila a estrutura formada por uma sequência de sarcômeros ligados em série. No miócito adulto, as miofibrilas apresentam disposição paralela ao eixo maior da célula. Cada célula cardíaca possui diversas miofibrilas (fig. 1.4), sendo que o volume ocupado por estas estruturas pode chegar a 50% do volume celular. Parece estar claro na literatura (Zot & Potter, 1987) que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é o evento que ativa os miofilamentos. Ca^{2+} liga-se à troponina C, proteína presente no filamento fino, causando modificação da conformação do conjunto troponina-tropomiosina. Esta modificação causa liberação da inibição que esta última exerce sobre a interação entre actina e miosina. Isto permite ativação das pontes cruzadas, caracterizada por ciclos de ligação actina-miosina, os quais resultam em deslização dos miofilamentos e produção de encurtamento celular.

O Citosol

O citosol é o meio no qual estão imersas as organelas e no qual difundem-se substâncias e íons entre organelas, e entre organelas e a membrana. Além disso, é sítio de inúmeras reações bioquímicas. Os miofilamentos estão imersos no citosol sem serem separados dele por membrana, logo é a concentração de cálcio no citosol que determina a probabilidade de ligação do íon com a troponina C. Por esta razão, a concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) é a variável cuja monitoração é importante, apesar de todo o cálcio presente no RS e nas mitocôndrias. O citosol constitui o *volume de mistura* do Ca^{2+} dentro da célula.

1.2 - Mecanismos de controle de $[Ca^{2+}]_i$

A cada contração do músculo cardíaco, um aumento rápido de $[Ca^{2+}]_i$, seguido do retorno ao nível basal, é verificado. Chamamos esta variação transitória de $[Ca^{2+}]_i$ de transiente de cálcio. Para efetuar estas variações em miócitos cardíacos de mamíferos, há pelo menos quatro mecanismos para redução e quatro para aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Os mecanismos de redução de $[Ca^{2+}]_i$ estão apresentados a seguir:

- i) ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS): esta enzima, presente na membrana do RS, promove o transporte ativo (acoplado à hidrólise de ATP) de Ca^{2+} do citosol para o interior da organela. O sistema de captação de Ca^{2+} do representa o mais potente dos mecanismos de redução de $[Ca^{2+}]_i$ no coração de mamíferos (Bers & Bridge, 1989; Bassani *et al.*, 1992; 1994a,b; Negretti *et al.*, 1993) e contribui para o reestabelecimento do principal estoque intracelular de cálcio.

- ii) Troca sódio-cálcio (Na/CaT): este sistema de contra-transporte, localizado no sarcolema, é bidirecional e opera às custas do gradiente de concentração transmembrana de Na^+ . O sentido do transporte depende do potencial de membrana e dos potenciais eletroquímicos dos dois íons envolvidos. No modo direto, este mecanismo transporta Ca^{2+} para o meio extracelular em troca da entrada de Na^+ ; no modo reverso, o Ca^{2+} entra na célula e o Na^+ sai. A estequiometria é de 3 Na^+ para 1 Ca^{2+} , sendo, portanto, uma troca eletrogênica (Mullins, 1981).

iii) ATPase de Ca^{2+} do sarcolema: o íon Ca^{2+} é bombeado ativamente para fora da célula por esta ATPase. Trata-se de um sistema de transporte com alta afinidade por Ca^{2+} , mas velocidade máxima de transporte relativamente baixa quando comparada à da extrusão de Ca^{2+} pela Na/CaT (Carafoli, 1991).

iv) Uniporter mitocondrial de Ca^{2+} : localizado na membrana mitocondrial interna, o uniporter possibilita o transporte de Ca^{2+} do citosol para o interior da mitocôndria à custa principalmente de enorme gradiente de potencial elétrico (~ -150 mV) gerado pelo transporte de prótons (Gunter & Pfeiffer, 1990). As características cinéticas deste mecanismo, os valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e o curso temporal do transiente de cálcio não permitem que estas organelas possam participar de modo significativo durante uma única contração, ou seja, "batimento-a-batimento" do coração (Crompton, 1985).

O aumento citosólico da concentração de cálcio se dá também por quatro mecanismos principais:

i) Abertura dos canais de Ca^{2+} do sarcolema: a abertura destes canais, causada pela despolarização da membrana durante o potencial de ação, faz com que Ca^{2+} entre rapidamente na célula a favor de seu gradiente de concentração. Parte do Ca^{2+} que entra participa diretamente da ativação dos miofilamentos e parte dispara a liberação de Ca^{2+} do RS.

ii) Liberação de Ca^{2+} pelo RS: cálcio armazenado no RS é liberado quando os canais de Ca^{2+} do RS (receptores de rianodina) se abrem, ativados pelo aumento da concentração de cálcio em sua proximidade. Este fenômeno é chamado de *liberação*

de cálcio induzida por cálcio (Fabiato, 1983). O RS é a maior fonte do Ca^{2+} ativador da contração no coração de mamíferos.

iii) A Na/CaT operando no modo reverso: dependendo das concentrações de Ca^{2+} e Na^+ dentro e fora da célula e do potencial de membrana, Na/CaT pode operar no modo reverso (e.g. durante o pico do PA) contribuindo para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Leblanc & Hume, 1990).

iv) Efluxo de Ca^{2+} do RS e mitocôndrias: vazamento de Ca^{2+} do RS gera um fluxo aparentemente contínuo de Ca^{2+} para o citosol. Este vazamento está associado à abertura aleatória de canais de Ca^{2+} , gerando eventos "unitários" de liberação do íon. Estas liberações de Ca^{2+} são chamadas de *sparks*. Acredita-se que a sincronização da liberação de grande número de canais pela entrada de Ca^{2+} durante o PA dê origem ao transiente de Ca^{2+} (Cheng et al., 1996). Ca^{2+} também pode ser extruído das mitocôndrias em contra-transporte com Na^+ ou por outro mecanismo (troca $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) Na^+ -independente (Gunter & Pfeiffer, 1990). No entanto, o efluxo de Ca^{2+} destas organelas, em condições normais, parece ser bastante baixo, no caso do RS (Bassani & Bers, 1995), ou lento, no caso das mitocôndrias (Bassani et al., 1993b) para que possa ter um papel importante durante transientes de cálcio individuais.

A figura 1.6 ilustra um esquema dos fluxos de Ca^{2+} em miócitos cardíacos de mamíferos.

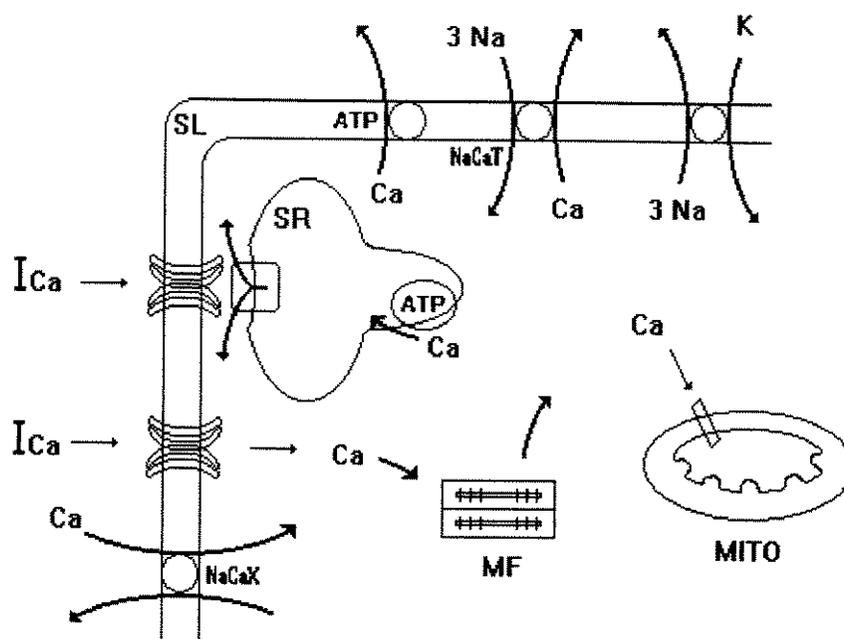


fig 1.6 - Esquema dos fluxos do íon cálcio em miócito cardíaco de mamífero. SL, sarcolema; I_{Ca} , corrente de Ca^{2+} pelos canais da membrana; NaCaT, troca Na/Ca; SR retículo sarcoplasmático; MF, miofilamentos; MITO, mitocôndria. A ATPase de Ca^{2+} da membrana está representada na face horizontal, indicada por transporte dependente de ATP. O uniporter mitocondrial está representado como uma via de transporte de Ca^{2+} do citosol para o interior da mitocôndria (modificado de Bers, 1991).

Tanto para o aumento quanto para a redução da $[Ca^{2+}]_i$ durante o ciclo cardíaco, a célula conta com mecanismos de transporte que geram fluxos de Ca^{2+} , não só entre o meio externo e o citosol, mas também entre este último e o interior das organelas. Em regime estacionário, a quantidade de Ca^{2+} que entra na célula a cada contração deve ser igual àquela extruída durante o relaxamento. De outro modo, a manutenção de um equilíbrio dinâmico dos fluxos de Ca^{2+} seria impossível, com progressiva sobrecarga seguida de morte celular, caso o influxo excedesse o efluxo,

ou ao contrário, o contínuo esvaziamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} e consequente redução da função contrátil.

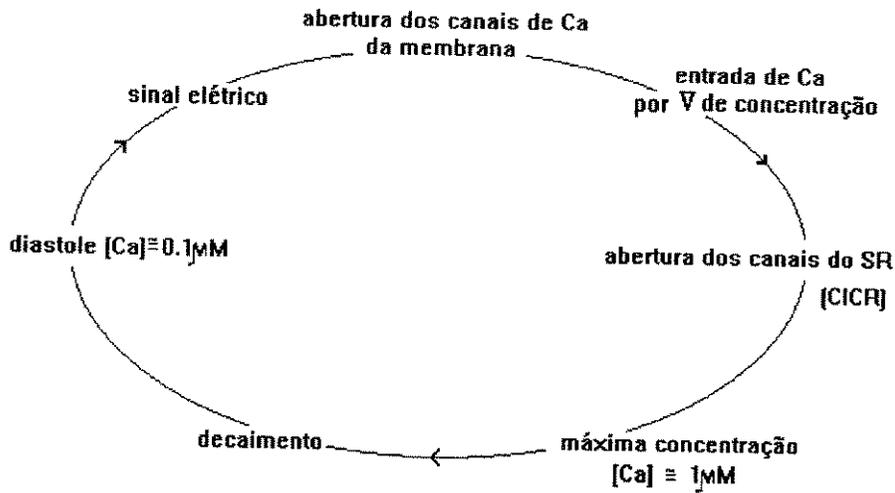


fig1.7 - esquema simplificado do curso temporal de um transiente de Ca.

A figura 1.7 ilustra a sequência temporal dos eventos envolvidos na geração de um transiente de Ca^{2+} . Na diástole, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normalmente é mantida por volta de 100 nM. A propagação de um PA e despolarização da membrana induzem a abertura de canais de Ca^{2+} . Há então um influxo de Ca^{2+} a favor do gradiente de concentração transmembrana (a concentração externa é da ordem de 1-2 mM). Parte do cálcio que entra vai ativar diretamente os miofilamentos, e parte dispara a liberação de Ca^{2+} pelo RS. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é então aumentada para valores próximos de 1 μM . A ação dos mecanismos de redução de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ faz com que esta seja diminuída, em seguida, para os seus valores de repouso. Como consequência da redução de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Ca^{2+} dissocia-se da troponina C, cessa a interação actina-miosina, e ocorre o relaxamento mecânico da célula.

1.3 - Como medir $[Ca^{2+}]_i$

Uma das primeiras tentativas de medição de $[Ca^{2+}]_i$ foi realizada utilizando-se uma proteína foto-luminescente chamada **aequorina** (Ridgway & Ashley, 1967). Esta proteína possui uma taxa de relaxação com emissão de luz que depende da concentração de Ca^{2+} do meio. Assim, medindo-se variações desta taxa consegue-se estimar a variação de $[Ca^{2+}]_i$.

Durante a década de 70 foram introduzidas duas outras técnicas, uma óptica e outra elétrica. A primeira utilizava o **arzenazo III**, substância que tem sua absorvância dependente da concentração de Ca^{2+} do meio. A segunda foi o desenvolvimento dos **microeletrodos seletivos** a Ca^{2+} (Ashley & Campbell, 1979). Apesar de úteis, nenhuma destas técnicas alcançou grande popularidade, ou por seu uso ser restrito a células grandes (aequorin e arzenazo III), ou pelas dificuldades técnicas de manipulação, como é o caso dos microeletrodos.

No começo da década de 80, surgiu a primeira geração de indicadores fluorescentes de cálcio, incluindo o **quin2** (Tsien *et al.*, 1982). Estes indicadores traziam duas características que aumentaram a área de aplicação da microscopia de fluorescência e a acurácia na quantificação das variáveis de interesse. A primeira, a possibilidade de se introduzir o indicador em células de qualquer tamanho, de maneira não lesiva (Tsien, 1981) . A segunda, a possibilidade de se aplicar o chamado método da razão na conversão da variável medida para a variável fisiológica (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1990; Kao, 1994). Uma outra geração de indicadores fluorescentes, principalmente **indo-1** e **fura-2**, (Grynkiewicz *et al.*, 1985) com eficiência quântica ainda maior do que a dos indicadores de primeira geração,

consolidou definitivamente a microscopia de fluorescência como uma das técnicas mais utilizadas para medição de $[Ca^{2+}]_i$.

A microscopia de fluorescência traz diversas vantagens com relação a outros métodos: permite o trabalho com células quase intactas, alta sensibilidade, resolução temporal da ordem de milissegundos e custo relativamente baixo.

Como medir $[Ca^{2+}]_i$ por fluorescência ?

Vários artigos na literatura descrevem detalhadamente como medir-se $[Ca^{2+}]_i$ utilizando-se indicadores fluorescentes (Sipido & Callewaert, 1995; Wahl *et al.*, 1990; Tsien *et al.*, 1985). Os indicadores fluorescentes de cálcio tipicamente têm seu espectro de emissão ou de excitação modificado quando ligados ao íon. Em geral, os passos para a medição de $[Ca^{2+}]_i$ incluem: carregar a célula com o indicador fluorescente, excitar o indicador com luz (normalmente U.V.), coletar a luz emitida e estimar as variações da $[Ca^{2+}]_i$ a partir de variações na intensidade de luz coletada.

O Projeto Temático FAPESP (95/0355-3) que vem sendo desenvolvido no LPCv-UNICAMP tem como objetivo a compreensão da dinâmica do Ca^{2+} intracelular em miócitos cardíacos durante o desenvolvimento pós-natal de ratos. Um dos objetivos específicos deste projeto é a determinação das faixas de variação de $[Ca^{2+}]_i$ durante uma contração, ao longo do desenvolvimento do animal.

Para que uma análise quantitativa seja feita, é fundamental que se obtenha a calibração *in vivo* do indicador fluorescente utilizado. Os parâmetros de calibração para o indicador dependem da composição do meio no qual ele se encontra (Konishi *et al.*, 1988; Hove-Madsen & Bers, 1992; Bassani *et al.*, 1995). Assim, como as

células cardíacas se modificam muito durante o desenvolvimento (Nakanishi et al., 1988), assumimos que os parâmetros de calibração pudessem não ser os mesmos em idades diferentes. A calibração é fundamental para que obtenhamos valores confiáveis para a faixa de variação e curso temporal do transiente de cálcio em idades diferentes, e estas informações trazem indicações sobre a regulação do Ca^{2+} , sendo então um trabalho de base para outros relacionados ao tema.

Para que a célula seja estudada na situação mais fisiológica possível, deve-se evitar o uso de eletrodos invasivos para a estimulação, sendo mais apropriada a estimulação por campo elétrico. Embora estimular um célula cardíaca com eletrodos externos possa parecer trivial, há na literatura (Klee & Plonsey, 1976; Ranjan & Thakor, 1995) indicações de que o limiar de estimulação depende fortemente da geometria da célula. Como a célula cardíaca muda tanto em tamanho quanto em forma durante o desenvolvimento, não há motivos para que o limiar se mantenha constante. Em trabalhos preliminares, já observamos que as células de um animal neonato não são facilmente estimuláveis, ou seja, possuem um limiar muito alto comparado ao da célula de animais adultos. Isto, além de trazer um problema prático (como estimulá-las sem o uso de tensões exageradamente altas), levanta questões interessantes sobre como o animal recém-nascido produz os campos necessários para disparar o potencial de ação, primeiro passo do acoplamento excitação-contração.

No presente trabalho, nós abordamos o problema de estimular adequadamente células de animais de diversas idades e estudamos a dinâmica de $[Ca^{2+}]_i$ destes animais, passando pela determinação dos parâmetros envolvidos na calibração do indicador indo-1 para medição de $[Ca^{2+}]_i$. Como parte inicial deste trabalho, nós

estudamos detalhadamente o fenômeno da fluorescência, estabelecemos condições para entendimento das condições mais adequadas para medição de $[Ca^{2+}]_i$, e construímos um sistema de microscopia de fluorescência que permite, além do monitoramento e registro da morfologia das células, a medição simultânea de transientes de Ca^{2+} em miócitos isolados.

Objetivos

Aprofundar os conhecimentos sobre os fenômenos envolvidos na medição quantitativa de $[Ca^{2+}]_i$ por microscopia de fluorescência.

Projetar e construir um sistema de microscopia de fluorescência de baixo custo, versátil e de bom desempenho.

Estudar o processo de estimulação por campo elétrico, obter os parâmetros de calibração para medição de Ca^{2+} por fluorescência e registrar transientes de cálcio em miócitos isolados de ratos durante o desenvolvimento pós-natal.

Primeira Parte :

Desenvolvimento da Instrumentação

Capítulo 2 - Bases Teóricas

Capítulo 3 - O Sistema de Microscopia de Fluorescência

Capítulo 4 - Testes de Bancada

Capítulo 5 - Testes Biológicos

Resultados e Discussão

Capítulo 2

Bases Teóricas

2.1 - O Fenômeno da Fluorescência

Quando um fóton de luz atinge um átomo ele pode ser absorvido, adicionando sua própria energia à energia de equilíbrio do átomo. Para retornar ao seu estado de menor energia (estatisticamente o mais provável) o átomo relaxa, podendo emitir, por sua vez, um fóton de luz. A emissão de fótons por átomos ou moléculas energeticamente excitadas é chamada de *luminescência*. Microscopicamente, absorção de um fóton por um átomo implica em redistribuição espacial eletrônica. Elétrons deixam sua configuração de menor energia, mudando o estado energético do átomo, de seu estado fundamental para um novo estado eletrônico excitado. É amplamente conhecido da Mecânica Quântica que os possíveis estados eletrônicos são quantizados (Rendel, 1987), ou seja, não é permitido ao átomo ter qualquer energia e sim um conjunto discreto de valores.

A luminescência pode ser dividida em dois fenômenos separados, dependendo de como a luz é emitida por um átomo ao retornar para o estado fundamental: se a emissão de luz resulta de uma transição quanticamente permitida (tipicamente em 10^{-8}

s) ela é chamada de *fluorescência*. Se, por outro lado, a emissão ocorre em tempos da ordem de segundos, devido a uma transição desfavorável ou proibida do átomo ao seu estado fundamental, o fenômeno é chamado de *fosforescência*, que não será analisado neste trabalho.

Além dos seus estados eletrônicos, moléculas possuem outros estados energéticos associados à rotação e vibração. Estes também são estados quantizados, mas com energias sempre menores que aquelas dos estados eletrônicos. Como consequência, estes estados vibracionais e rotacionais modificam o diagrama de energia (diagrama de Jablonski), introduzindo estruturas a cada estado eletrônico (fig 2.1).

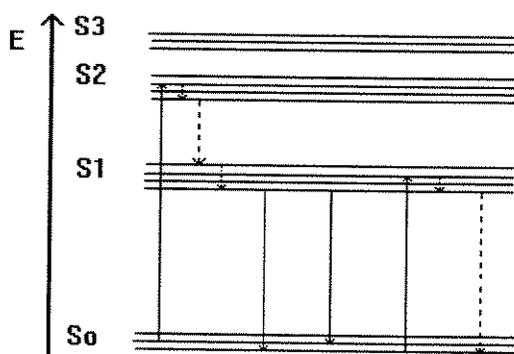


fig 2.1 - Diagrama de Jablonski para uma molécula em solução. A primeira linha representa a absorção de um fóton levando o átomo do estado fundamental (S_0) ao segundo estado eletrônico excitado (S_2). Depois temos relaxação de S_2 a S_1 sem emissão de fóton. Representamos em seguida a relaxação de S_1 até dois dos possíveis níveis rotacionais e vibracionais do estado fundamental. Temos depois a absorção de um fóton levando a molécula de S_0 a S_1 , seguida de relaxação sem emissão.

Na maioria dos casos, moléculas no estado condensado ou em solução rapidamente relaxam para os seus estados vibracionais e rotacionais de menor energia

do primeiro estado eletrônico excitado. Este processo é denominado de conversão interna e ocorre na faixa de 10^{-12} s. Somente a partir daí que uma mudança para algum estado rotacional ou vibracional do estado eletrônico fundamental, irá ocorrer. Esta transição pode ou não ser acompanhada de emissão de um fóton.

O espectro de emissão de uma molécula em solução se apresenta com contorno liso e sem estruturas finas (fig 2.2). Isto se deve a vários fatores, mas principalmente ao fato que, em solução, a interação das moléculas com o solvente faz com que ela tenha seus níveis energéticos ligeiramente alterados. Assim, duas moléculas da mesma substância podem emitir fótons com diferentes quantidades de energia associadas à mesma transição energética. A composição de todas estas emissões irá resultar em um espectro aparentemente contínuo.

A transição do primeiro estado eletrônico excitado ao estado fundamental pode ou não ser acompanhada de emissão de luz. A probabilidade de relaxação com emissão de um fóton é denominada de *quantum yield*, Q , e é uma característica básica da molécula estudada. Esta probabilidade é numericamente igual ao número de fótons emitidos por uma amostra dividido pelo número de fótons efetivamente absorvidos por ela.

Nos indicadores de $[Ca^{2+}]_i$ de última geração Q pode atingir valores ao redor de 0.5, o que os caracteriza como indicadores altamente fluorescentes.

Para saber a probabilidade de emissão em uma certa faixa entre λ e $\lambda + d\lambda$ devemos normalizar o espectro de emissão da substância de modo que a integral da curva Intensidade vs. λ , seja igual a Q . A probabilidade $P(\lambda) d\lambda$ de emissão entre λ e $\lambda + d\lambda$ será a área sob a curva entre estes dois pontos (fig 2.2).

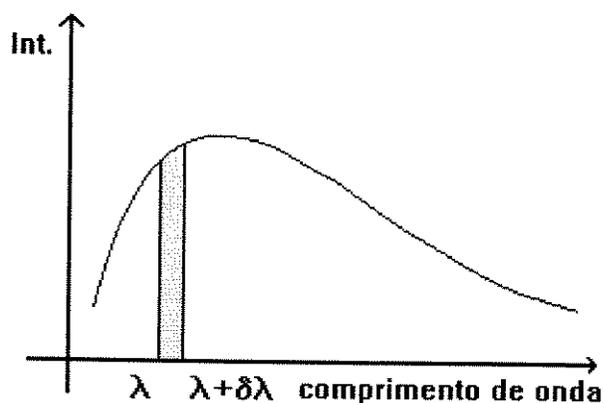


fig 2.2 - Espectro de Emissão típico para molécula em solução, normalizado de modo que a integral da curva seja numericamente igual a Q . A probabilidade de emissão entre os comprimentos de onda λ e $\lambda+d\lambda$ é dada pela área da curva entre estes dois pontos.

Mostramos que Q relaciona o número de fótons absorvidos com o número de fótons emitidos pela substância fluorescente. A figura 2.3 ilustra a absorção de luz por uma amostra de espessura δ e área A exposta ao feixe de luz de densidade ρ . A expressão para a intensidade de luz ao longo do eixo x é (Lakowicz, 1991; Lotian, 1949):

$$I(x) = I_1 \cdot 10^{-\epsilon cx} \quad (2.1)$$

onde I_1 é a intensidade da luz incidente (δA); x é uma certa distância dentro da amostra; $I(x)$ é a intensidade de luz em x ; c é a concentração molar da substância absorvedora e ϵ é o seu coeficiente de extinção.

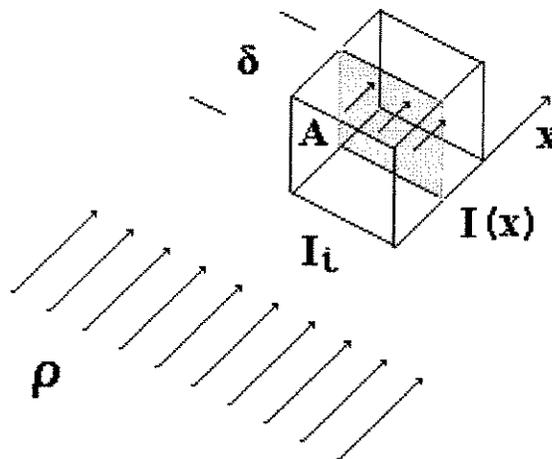


fig. 2.3 -Variação da intensidade de luz passando por uma amostra: ρ é a densidade de luz; A e δ são respectivamente a área e a espessura da amostra; I_i é a intensidade de luz incidente sobre ela e $I(x)$ é a intensidade de luz que chega a um plano à distância x da face da amostra.

O coeficiente de extinção de uma substância depende das propriedades intrínsecas de suas moléculas e do comprimento de onda da luz de excitação. Em outras palavras, ϵ representa a capacidade de absorção de luz para um certo comprimento de onda de excitação. Para condições nas quais a absorção é pequena, a equação 2.1 pode ser expandida em série de Taylor:

$$I(x) \sim I_i (1 - \epsilon c x) \quad (2.2)$$

Se a espessura da amostra é δ , a expressão da intensidade total de luz absorvida é:

$$I_{ab} = I_i - I(\delta) \sim I_i \epsilon c \delta = \rho \cdot A \cdot \delta \cdot \epsilon \cdot c \quad (2.3)$$

Nesta expressão, o produto $A \cdot c \cdot \delta$ é igual ao número de moléculas da substância fluorescente presente na amostra.

O total de luz emitida e a intensidade de luz na faixa entre λ e $\lambda+d\lambda$ serão:

$$I_t = \rho \cdot A \cdot \delta \cdot \epsilon \cdot c \cdot Q \quad (2.4)$$

$$I_\lambda = \rho \cdot A \cdot \delta \cdot \epsilon \cdot c \cdot P(\lambda) d\lambda \quad (2.5)$$

Estas expressões serão utilizadas mais a frente quando analisarmos o significado microscópico das constantes que aparecem na equação fundamental do método da razão.

2.2 - O Método da Razão

O Método da Razão é uma técnica utilizada para se determinar a concentração de uma substância que, ao reagir com um indicador fluorescente, modifica de alguma forma seu espectro de excitação ou emissão. No desenvolvimento que segue vamos tomar um exemplo específico, a determinação de [Ca] com o uso do indicador indo-1. Este indicador, além de ser amplamente utilizado em microfluorímetros, vem cada dia mais se firmando em microscopia confocal (Minamikawa et al., 1993; 1995; Niggli et al., 1994; Schild, 1996).

Para o desenvolvimento inicial vamos simplificar a equação 2.5 de modo a ficarmos com a expressão:

$$I_\lambda = \rho A \delta \epsilon P(\lambda) d\lambda c = S c \quad (2.6)$$

Ou seja, a intensidade emitida em uma faixa $d\lambda$ em torno de λ depende de uma certa constante S e é proporcional à concentração c do indicador.

Em amostras carregadas com o indicador indo-1, este se apresenta em duas formas fluorescentes com espectros de emissão distintos: o indicador livre de Ca^{2+} e o complexo indo-1+ Ca^{2+} (fig 2.4). Chamemos as respectivas concentrações de c_f e c_b .

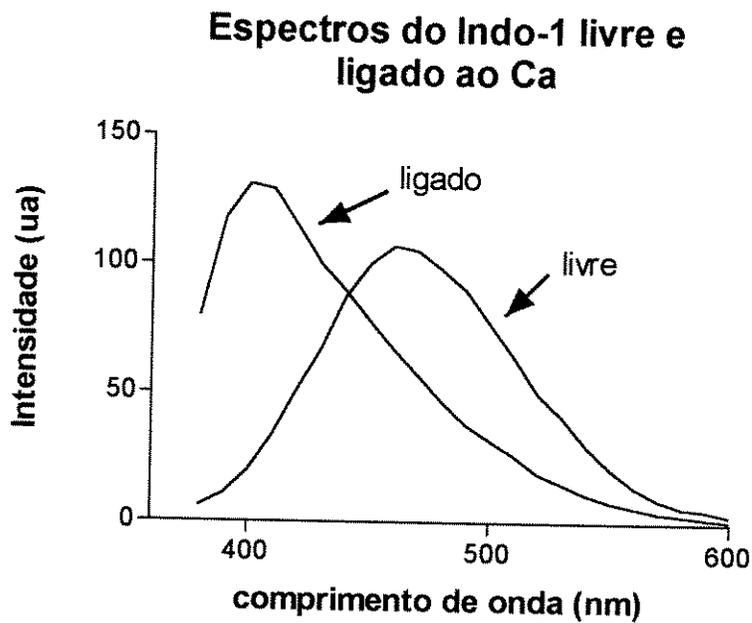


fig. 2.4 - espectro de indo-1 livre e ligado ao cálcio.

O Método da Razão baseia-se na medição de intensidades de luz em dois comprimentos de onda diferentes, λ_1 e λ_2 . Temos então as seguintes equações:

$$I_1 = S_{f1} c_f + S_{b1} c_b \quad (2.7)$$

$$I_2 = S_{f2} c_f + S_{b2} c_b \quad (2.8)$$

$$c_b = c_f [\text{Ca}] / K_d \quad (2.9)$$

As equações 2.7 e 2.8 descrevem, respectivamente, as intensidades de luz emitidas nos dois comprimentos de luz λ_1 e λ_2 . Nestas equações S_f e S_b são constantes de proporcionalidade para, respectivamente, as duas formas do indicador, livre e ligada. A equação 9 relaciona as concentrações de indo-1 livre e ligado. K_d é a constante de dissociação aparente do indicador, que deve ser determinada experimentalmente.

Dividindo a equação 2.7 pela equação 2.8 e substituindo c_b pelo lado direito da equação 2.9, nós relacionamos a razão I_1 / I_2 a $[Ca^{2+}]$. Resolvendo para $[Ca^{2+}]$ e substituindo I_1 / I_2 por \mathcal{R} :

$$[Ca] = K_d (S_{f2} / S_{b2}) \{ [\mathcal{R} - (S_{f1} / S_{f2})] / [(S_{b1} / S_{b2}) - \mathcal{R}] \} \quad (2.10)$$

A constante S_{f1}/S_{f2} será chamada de \mathcal{R}_{min} , pois ela é equivalente a I_1/I_2 na condição específica na qual o indicador está livre de Ca^{2+} (ver equações 2.7 e 2.8). Por analogia, a razão S_{b1}/S_{b2} será chamada de \mathcal{R}_{max} no caso em que o indicador está saturado de Ca^{2+} .

Vamos chamar a constante S_{f2} / S_{b2} de β . Esta constante pode ser determinada a partir de I_2 com as concentrações de Ca^{2+} colocadas no mínimo e no máximo, desde que o número de moléculas do indicador ($A \delta c$) e a densidade da luz de excitação (ρ) sejam mantidos constantes.

Com as definições acima, $[Ca^{2+}]$ pode ser calculada como sendo:

$$[Ca] = K_d \cdot \beta \{ (\mathcal{R} - \mathcal{R}_{min}) / (\mathcal{R}_{max} - \mathcal{R}) \} \quad (2.11)$$

A equação 2.11, relacionando $[Ca^{2+}]$ a \mathcal{R} , é a equação fundamental do método da razão. Assim, $[Ca^{2+}]$ pode ser calculada com esta equação desde que os parâmetros de calibração \mathcal{R}_{min} , \mathcal{R}_{max} , β e K_d sejam conhecidos.

Interpretação Microscópica de \mathcal{R}_{min} , \mathcal{R}_{max} e β

Para melhor compreendermos o método da razão, é necessário dar significado físico aos parâmetros encontrados na equação 2.11. Com base nas definições prévias e na equação 2.5 pode-se escrever:

$$\mathcal{R}_{min} = P_f(\lambda_1) d\lambda_1 / P_f(\lambda_2) d\lambda_2 \quad (2.12)$$

$$\mathcal{R}_{max} = P_b(\lambda_1) d\lambda_1 / P_b(\lambda_2) d\lambda_2 \quad (2.13)$$

$$\beta = (P_f(\lambda_2) d\lambda_2 \cdot \epsilon_f) / (P_b(\lambda_2) d\lambda_2 \cdot \epsilon_b), \text{ com } (A \cdot \delta \cdot c) \text{ and } \rho \text{ constante} \quad (2.14)$$

As expressões acima mostram que \mathcal{R}_{min} e \mathcal{R}_{max} dependem das propriedades de ambas as formas do indicador indo-1, livre e ligada, dos comprimentos de onda, e das bandas passantes escolhidas para a luz emitida. \mathcal{R}_{min} é a razão das probabilidades de uma molécula de indo-1 livre de Ca^{2+} emitir luz nos comprimentos de onda λ_1 e λ_2 . \mathcal{R}_{max} é a razão das probabilidades de emissão nos comprimentos de onda λ_1 e λ_2 para uma molécula de indo-1 ligada a Ca^{2+} .

Para compreender β , temos que examinar a expressão no numerador da equação 2.14. O coeficiente de extinção, ϵ_f , é a capacidade da molécula de indo-1 livre absorver fótons. $P_f(\lambda_2) d\lambda_2$ é a probabilidade desta molécula emitir em λ_2 . Em outras palavras, a expressão $P_f(\lambda_2) d\lambda_2 \epsilon_f$ pode ser interpretada como a capacidade da molécula de indo-1 não ligada a Ca^{2+} absorver luz de comprimento de onda λ e convertê-la em luz em de comprimento de onda λ_2 . Por analogia, $P_b(\lambda_2) d\lambda_2 \epsilon_b$ seria o mesmo tipo de eficiência de conversão da molécula de indo-1 em sua forma ligada. β é a razão entre estas duas eficiências de conversão, contanto que o produto $\rho \cdot A \cdot \delta \cdot c$ seja constante.

O Ponto Isobéstico

Indicadores como o indo-1 apresentam desvios do espectro quando ligados ao Ca^{2+} . No entanto, em um comprimento de onda particular, há intersecção dos espectros das duas formas do indicador (fig 2.4). Neste ponto, a intensidade da emissão não depende das participações relativas de c_f e c_b . Este comprimento de onda é chamado de ponto isobéstico. Para este ponto particular, é possível definir a constante I_{ISO} como:

$$\begin{aligned}
 I_{\text{ISO}} &= S_{fi} \cdot c_f + S_{bi} \cdot c_b \\
 &= \rho \cdot A \cdot \delta \cdot \epsilon_f \cdot P_f(\lambda_{\text{ISO}}) d\lambda \cdot c_f + \rho \cdot A \cdot \delta \cdot \epsilon_b \cdot P_b(\lambda_{\text{ISO}}) d\lambda \cdot c_b \quad (2.15)
 \end{aligned}$$

Na equação 2.15, c_b pode ser eliminada se considerarmos a concentração total do indicador constante, ou:

$$c_b + c_f = c,$$

Rearranjando a equação 2.15 para I_{ISO} , temos que:

$$I_{ISO} = \rho \cdot A \cdot \delta \cdot d\lambda_{ISO} \{ [P_f(\lambda_{ISO}) \varepsilon_f - P_b(\lambda_{ISO}) \varepsilon_b] c_f - [P_b(i) \varepsilon_b] \}$$

Por definição, I_{ISO} é independente de c_b e c_f no ponto isobéstico, e o segundo termo entre colchetes é uma constante. Deste modo, $P_f(\lambda_{ISO}) \varepsilon_f - P_b(\lambda_{ISO}) \varepsilon_b$ deve ser igual a zero para manter I_{ISO} independente de c_f . Neste caso,

$$P_f(\lambda_{ISO}) d\lambda_{ISO} \cdot \varepsilon_f = P_b(\lambda_{ISO}) d\lambda_{ISO} \cdot \varepsilon_b$$

A interpretação microscópica da expressão acima indica que, no ponto isobéstico, as eficiências de conversão de ambas as formas de indo-1, livre e ligada, são numericamente iguais.

Interpretação Gráfica do Método da Razão

Até agora, o método da razão foi analisado de modo independente das características do sistema de fluorescência a ser usado. Para melhor compreender alguns eventos que ocorrem trabalhando-se com um simples fluorímetro ou com um microscópio confocal, foi desenvolvido, neste trabalho, um diagrama para o método da razão. Com este diagrama, serão discutidos agora alguns dos eventos comuns

durante a medição de $[Ca^{2+}]$ em células isoladas. Apresenta-se a seguir uma formulação para definir as condições para determinação de β com maior acurácia.

Seja I_1 a quantidade total de luz emitida pela amostra, numa faixa de comprimento de onda entre λ_1 e $\lambda_1 + d\lambda_1$, e I_2 , a emissão entre λ_2 e $\lambda_2 + d\lambda_2$. Pode ser definido o vetor I_{min} , cujas componentes (I_{min2} , I_{min1}) são as intensidades de luz emitida pela amostra em cada faixa quando a $[Ca^{2+}]$ é muito pequena ($[Ca^{2+}] \ll Kd \beta$). Por analogia, define-se I_{max} , com seus componentes (I_{max2} , I_{max1}) para uma $[Ca^{2+}]$ saturante, na qual todas as moléculas do indicador encontram-se ligadas ao íon.

Os números de fótons emitidos com comprimento de onda λ_2 e λ_1 podem ser representados num plano cartesiano, nas abscissas e ordenadas, respectivamente (fig. 2.5). Se, neste gráfico, os vetores I_{min} e I_{max} forem representados, e os ângulos que estes vetores formam com o eixo das abscissas forem chamados, respectivamente, α_{min} e α_{max} , as tangentes destes ângulos serão, por construção, iguais a \mathcal{R}_{min} e \mathcal{R}_{max} , respectivamente. A constante β para a amostra em estudo pode ser obtida a partir da razão das projeções dos vetores I_{min} e I_{max} no eixo das abscissas.

Durante um experimento no qual a $[Ca^{2+}]$ se altera dentro da amostra, a trajetória descrita pelos pontos $I = (I_2, I_1)$ será a reta que conecta os dois vetores I_{max} e I_{min} . Pode ser demonstrado que (ver Anexo, pag. 45) :

$$I_1 = (S_{f1} - S_{b1}) / (S_{f2} - S_{b2}) I_2 + c \{ (S_{b1} \cdot S_{f2} - S_{f1} \cdot S_{b2}) / (S_{f2} - S_{b2}) \} \quad (2.16)$$

A tangente do ângulo α , entre a reta que conecta qualquer ponto $I (I_2, I_1)$ à origem e ao eixo das abscissas, é numericamente igual (em analogia a α_{min} e α_{max}) à razão \mathcal{R} .

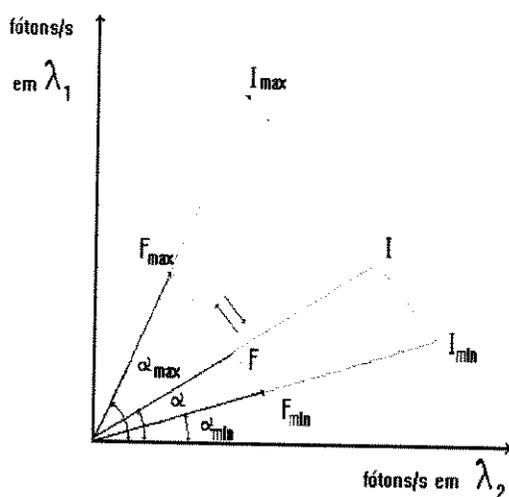


fig. 2.5 - Diagrama do Método da Razão. Os vetores I representam as intensidades de luz totais emitidas pela amostra. Os vetores F as intensidades medidas pelos fotosensores

Não há um instrumento ideal, capaz de coletar 100% da luz emitida. Qualquer equipamento com uma objetiva de fluorescência típica tem sua eficiência limitada em cerca de 50% quando, no melhor caso, a distância entre a objetiva e amostra é próxima de zero. Se forem levados em conta os outros componentes e detectores, a eficiência óptica total (Y) cai para menos de 30 a 40%.

Considerando-se agora um sistema não ideal para medição de fluorescência com eficiência óptica Y , os vetores F_{min} , F_{max} e F podem ser definidos com componentes que são efetivamente as contagens de fótons, i.e., $F = (F_2, F_1) = (Y \cdot I_2, Y \cdot I_1)$. Para poder distinguir entre a razão das intensidades emitidas (\mathcal{R}) e a razão das intensidades medidas, define-se esta última como $R = F_1 / F_2$. Neste caso:

$$R = Y \cdot I_2 / Y \cdot I_1 = \mathcal{R} \quad (2.17)$$

Se o equipamento coleta luz com 40% de eficiência (i.e., $Y = 0.4$) em ambos os canais, pode-se ver que, mesmo que nem toda a luz emitida pela amostra seja coletada, R , R_{min} , R_{max} e β são numericamente iguais a \mathcal{R} , \mathcal{R}_{min} , \mathcal{R}_{max} and β . Portanto, não há erro na estimativa de $[Ca^{2+}]$ apesar de não medirmos toda a luz emitida.

A situação na qual a eficiência de um canal é maior que a do outro está mostrada na figura 2.6. Neste caso, $Y_1 = 0.33$ e $Y_2 = 0.5$. Podemos ver que R_{min} , R_{max} e R não são iguais a \mathcal{R}_{min} , \mathcal{R}_{max} e \mathcal{R} , mas a estes valores multiplicados por Y_1/Y_2 . O valor de β não se altera.

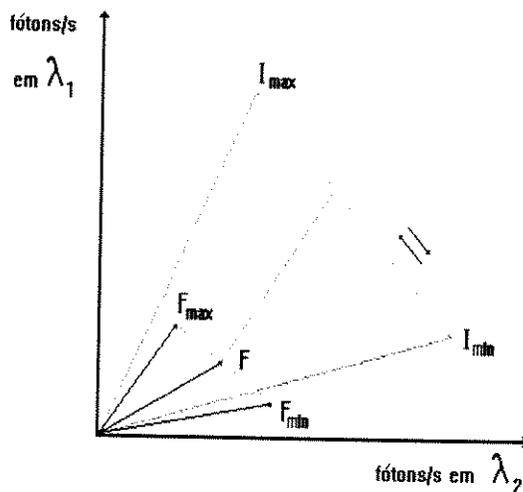


fig. 2.6 - Diagrama para um sistema com eficiência de transmissão diferente para os dois comprimentos de onda. Canal 1 = 33 %, canal 2 = 50 % .

Analisando a equação 2.11 concluímos no entanto que, por estes fatores estarem sendo multiplicados pela mesma constante, o valor da $[Ca^{2+}]$ calculada não se altera. Portanto, a diferença na eficiência dos canais não parece ser um fator relevante

A fluorescência de fundo (*background*) está sempre presente nos experimentos do dia-a-dia. Usando o diagrama do método da razão, é possível

analisar o efeito de uma fluorescência de fundo não corrigida simplesmente pela adição do vetor $\mathbf{B}_G = (B_{G2}, B_{G1})$ a \mathbf{F} . Fica claro (fig 2.7 a) que a faixa de trabalho será reduzida se $\alpha_{\min} < \alpha_{BG} < \alpha_{\max}$. Neste caso, R nunca alcançará R_{\min} ou R_{\max} . Se $\alpha_{BG} < \alpha_{\min}$ ou $\alpha_{BG} > \alpha_{\max}$, R poderá ser anormalmente maior que R_{\max} ou menor que R_{\min} (fig 2.7 b), o que tornaria impossível a conversão de R para $[\text{Ca}^{2+}]$.

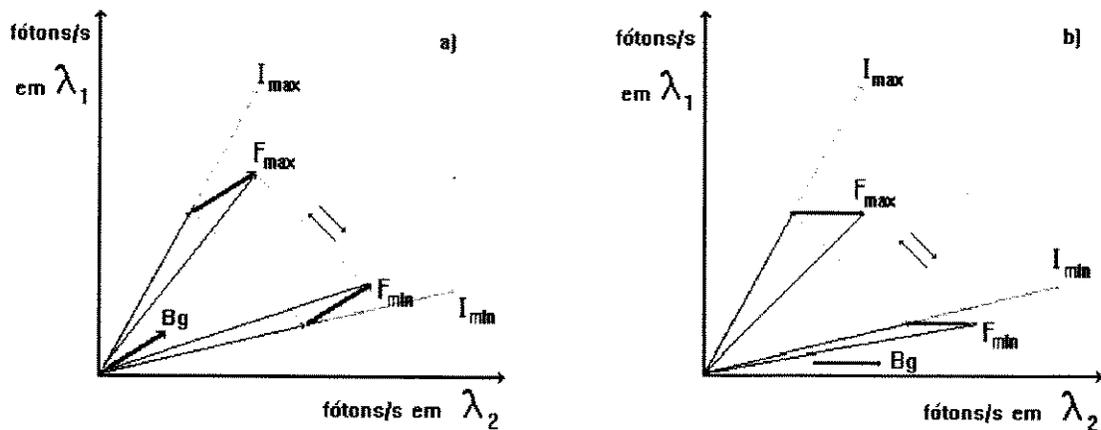


fig 2.7 - Representação para sinal sem subtração correta do *background*: a) $\alpha_{\min} < \alpha_{bg} < \alpha_{\max}$ e b) $\alpha_{\min} > \alpha_{bg}$.

Medindo β com Maior Acurácia

Para medir β , normalmente é necessário que $F_{\min 2}$ e $F_{\max 2}$ sejam obtidas em condições tais que a concentração do indicador seja mantida constante na amostra. Infelizmente, isto não é fácil quando se trabalha com amostras biológicas, particularmente células cardíacas isoladas. Especialmente durante a determinação de R_{\max} , é frequente que parte do indicador seja perdida devido a lesão da membrana

celular. Pode-se observar, por exemplo, que, embora os valores de R_{\max} sejam razoavelmente constantes em diferentes células, a intensidade de fluorescência emitida pode diminuir durante o experimento para diferentes níveis num dado conjunto de células.

A seguir, descreve-se um procedimento simples que permite a determinação de β pelo uso do diagrama do método da razão. Neste procedimento, R_{\min} e R_{\max} são usados, mas o valor de fluorescência em λ_2 , (F_2) não é necessário. No nosso entender este procedimento permite que β seja determinado com maior acurácia.

Suponha que transientes de Ca^{2+} sejam medidos em uma dada condição experimental. Inicialmente, traçamos os pontos $F = (F_2, F_1)$ obtidos à medida que R varia nos transientes de Ca^{2+} . Não necessariamente no mesmo grupo de células, R_{\min} e R_{\max} são determinados de modo presumivelmente acurado. Definimos então duas retas que são suportes para os vetores F_{\min} e F_{\max} e plotamos estes vetores no diagrama (fig. 2.8), de modo que:

$$Y = R_{\min} \cdot X \quad (2.18)$$

$$Y = R_{\max} \cdot X \quad (2.19)$$

A linha ajustada aos pontos $F(F_2, F_1)$ é uma reta definida por (ver apêndice):

$$Y = a \cdot X + b \quad (2.20)$$

A intersecção das retas dadas pelas equações 2.18 e 2.20 tem abcissa $X_{\min 2} = b / (R_{\max} - a)$. Analogamente, usando as equações 2.19 e 2.20, $X_{\max 2} = b / (R_{\min} - a)$.

Do diagrama da figura 2.8, o parâmetro β (para esta célula em particular) é calculado como $X_{\min 2} / X_{\max 2}$, ou:

$$\beta = (R_{\max} - a) / (R_{\min} - a) \quad (2.21)$$

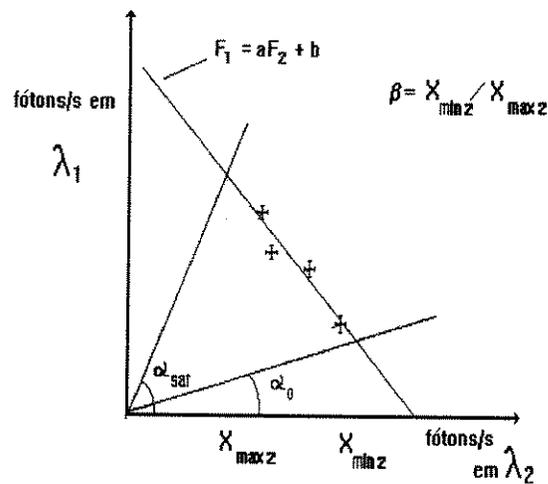


fig. 2.8 - Determinação de β a partir do Diagrama do Método .

Se λ_1 e λ_2 são escolhidos, dos lados opostos do ponto isobéptico, como é usual, a é sempre negativo. Assim o valor de β é limitado à faixa:

$$1 < \beta < R_{\max} / R_{\min} \quad (2.22)$$

Em resumo, com este procedimento, nós simplificamos a tarefa da determinação experimental de β e ainda estabelecemos limites teóricos para seu valor.

Sensibilidade do Método da Razão

O método da razão não é igualmente sensível para todos os valores de $[Ca^{2+}]$. Vamos caracterizar sensibilidade, $S([Ca])$, como a função que relaciona a variação percentual de $[Ca]$ com a variação percentual de R .

$$dR/R = S([Ca^{2+}]) \cdot d[Ca^{2+}] / [Ca^{2+}] \quad (2.23)$$

Sabemos que a curva que relaciona R com $K_d \beta$ é uma sigmoide. Deste modo a primeira impressão é de que a maior sensibilidade esteja localizada na faixa "reta" da curva, ou seja, em torno de uma unidade de $K_d \beta$. Contudo uma inspeção cuidadosa da equação 2.11 mostra que isto não é o que acontece.

Evidenciando R na equação 2.11:

$$R = \{ (R_{\max} [Ca^{2+}] / K_d \beta) + R_{\min} \} / \{ ([Ca^{2+}] / K_d \beta) + 1 \} \quad (2.24)$$

que após derivação com relação a $[Ca^{2+}]$, resulta:

$$dR/R = \{ K_d \beta [Ca^{2+}] (R_{\max} - R_{\min}) / ([Ca^{2+}] + K_d \beta) ([Ca^{2+}] R_{\max} + K_d \beta R_{\min}) \} d[Ca^{2+}] / [Ca^{2+}]$$

A função sensibilidade fica então:

$$S([Ca^{2+}]) = K_d \beta [Ca^{2+}] (R_{\max} - R_{\min}) / ([Ca^{2+}] + K_d \beta) ([Ca^{2+}] R_{\max} + K_d \beta R_{\min}) \quad (2.25)$$

O máximo de S ($[Ca]$) está localizado em:

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \beta (R_{\min}/R_{\max})^{1/2} \quad (2.26)$$

Neste ponto a função sensibilidade é:

$$S_{\max} = [1 - (R_{\min}/R_{\max})] / [1 + (R_{\min}/R_{\max})^{1/2}]^2 \quad (2.27)$$

A figura 2.9 ilustra curvas de sensibilidade para três valores (0,3 , 0,1 , e 0,03) de R_{\min}/R_{\max} . A função S pode representar uma ajuda efetiva para aqueles interessados em definir um indicador de Ca^{2+} ou decidir a respeito da compra de um equipamento em particular. Verificamos que o máximo de sensibilidade está sempre em um valor de Ca^{2+} abaixo de uma unidade de $K_d \beta$.

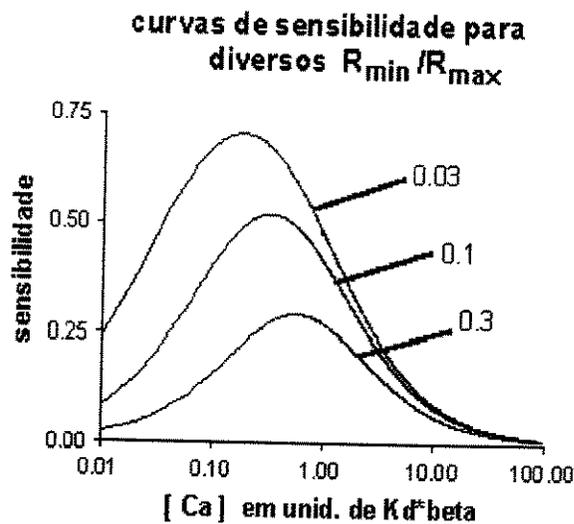


fig.2.9 - Curvas de sensibilidade para três valores diferentes de R_{\min}/R_{\max} . Observar que o máximo ocorre em valores de $[Ca]$ menores que $K_d \beta$.

Propagação de Erro

Ao lado de erros introduzidos pela flutuação estatística de R , há erros sistemáticos na determinação de $[Ca^{2+}]$ devido a falta de acurácia nos parâmetros de calibração utilizados. Uma vez que K_d e β são fatores multiplicativos na equação 11, os erros introduzidos por eles são lineares. Deste modo, 10% de desvio em qualquer destes parâmetros irá implicar em 10% de desvio na $[Ca^{2+}]$, para qualquer nível de $[Ca^{2+}]$ considerado.

O mesmo não é verdade para R_{min} e R_{max} . Da teoria básica dos erros (Beers, 1957), é possível determinar que o erro relativo em $[Ca^{2+}]$, ϵ_{Ca} , é relacionado ao erro relativo em R_{min} , ϵ_{Rmin} , pelas seguintes equações:

$$\epsilon_{Ca} = -R_{min} / (R - R_{min}) \cdot \epsilon_{Rmin} \quad (2.28)$$

onde

$$\epsilon_{Ca} = ([Ca^{2+}]_{medido} - [Ca^{2+}]_{real}) / ([Ca^{2+}]_{medido}) \quad (2.29)$$

$$\epsilon_{Rmin} = (R_{min} - R_{min}) / R_{min} \quad (2.30)$$

Aqui, R_{min} é o parâmetro de calibração usado e R_{min} é o valor real do parâmetro.

ϵ_{Ca} pode ser escrito como uma função de ϵ_{Rmin} e R / R_{min} :

$$\epsilon_{Ca} = \epsilon_{Rmin} / (\epsilon_{Rmin} + 1 + R / R_{min}) \quad (2.31)$$

A figura 2.10 ilustra o comportamento da função ε_{Ca} para seis valores de ε_{Rmin} .

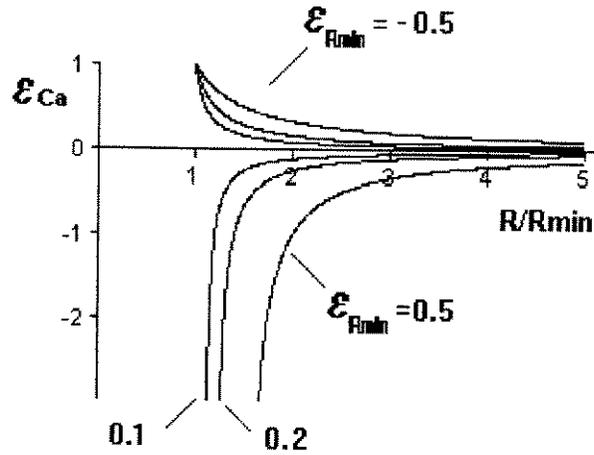


fig 2.10 - ε_{Ca} em função de R / R_{min} . Podemos ver que ε_{Ca} não é simétrico com relação ao sinal de ε_{min} .

O valor da $[Ca^{2+}]_{real}$ pode ser obtida de ε_{Ca} por meio da seguinte expressão:

$$[Ca^{2+}]_{real} = \{(1 - \varepsilon_{Ca}) [Ca^{2+}]_{medido}\} \quad (2.32)$$

É possível observar que a magnitude do erro introduzido é altamente dependente do sinal de ε_{Rmin} , de modo que o erro introduzido por desvios positivos ou negativos é assimétrico. Embora valores médios sejam normalmente usados para reduzir o erro global das medições, neste caso, por causa da assimetria mencionada acima, o valor médio não é a melhor escolha para estes parâmetros. Se medirmos valores muito baixos de $[Ca^{2+}]$, os valores de R serão provavelmente próximos de

R_{\min} . Se o valor médio de R_{\min} é usado para calibração, as amostras com R_{\min} abaixo deste valor teriam de ser descartadas (cerca de 50% dos casos), pois a conversão de R para $[Ca^{2+}]$ resultaria em valores negativos. Uma solução mais adequada para evitar uma perda significativa de dados importantes seria aceitar como R_{\min} o limite inferior do intervalo de confiança para 95% dos valores de R_{\min} medidos para a determinação do parâmetro. Analogamente para R_{\max} , um critério seria o limite superior deste intervalo.

Anexo1 - demonstração de que pontos $I = (I_2, I_1)$ descrevem uma reta no diagrama do método da razão.

Pondo c_b em evidência na equação 2.9 e substituindo em 2.7 e 2.8 temos :

$$I_1 = (S_{f1} - S_{b1}) c_f + S_{b1} c$$

$$I_2 = (S_{f2} - S_{b2}) c_f + S_{b2} c$$

Isolando c_f nas duas equações acima temos:

$$(I_1 - S_{b1} c) / (S_{f1} - S_{b1}) = c_f$$

$$(I_2 - S_{b2} c) / (S_{f2} - S_{b2}) = c_f$$

Igualando as expressões à esquerda e isolando I_1 chegamos finalmente a :

$$I_1 = (S_{f1} - S_{b1}) / (S_{f2} - S_{b2}) I_2 + c \{ (S_{b1} S_{f2} - S_{f1} S_{b2}) / (S_{f2} - S_{b2}) \} \quad (24)$$

Ou seja, $I_1 = a I_2 + b$, com:

- **a** dependendo dos coeficientes de extinção (ϵ_b e ϵ_f), e das probabilidades de emissão para as duas formas do indicador, nos dois comprimentos de onda e bandas escolhidos: $P_f(\lambda_1) d\lambda_1$, $P_b(\lambda_1) d\lambda_1$, $P_f(\lambda_2) d\lambda_2$ e $P_b(\lambda_2) d\lambda_2$.
- **b** dependendo, além destes valores, da concentração total do indicador (c), da intensidade de luz de excitação (I_i) e da espessura da amostra (δ)

Capítulo 3

O Sistema de Microscopia de Fluorescência

Ao projetarmos a instrumentação tínhamos em mente alguns pontos fundamentais a satisfazer :

- deveríamos ser capazes de movimentar uma câmara de perfusão com células isoladas, em frente a uma objetiva de microscópio.
- a célula, iluminada por uma luz vermelha monocromática, deveria ter sua imagem formada em uma câmara de TV para ser visualizada em um monitor.
- a célula, devidamente carregada com o indicador fluorescente indo-1 , deveria ser excitada por luz de comprimento de onda em torno de 350 nm e banda inferior a 20nm.
- a fluorescência emitida pela célula seria então coletada e guiada até algum tipo de fotosensor. Para que o método da razão pudesse ser aplicado, pelo menos dois comprimentos de onda deveriam ser monitorados
- os dois sinais obtidos deveriam ser processados, filtrados e registrados de modo que pudessemos monitorar o experimento em tempo real e posteriormente tratar e analisar os dados coletados.

Baseados nestes pontos desenvolvemos a montagem descrita a seguir.

3.1 - O Sistema Óptico

A estabilidade mecânica de um instrumento que visa coletar sinais de fluorescência de células isoladas é uma de suas características fundamentais. Começamos a montagem pelo projeto e construção de uma bancada metálica bastante rígida apoiada em pés tipo *VibraStop* (fig. 3.1). Sobre esta bancada posicionamos um bloco de granito (~ 50 Kg) apoiado sobre bolas de tênis.

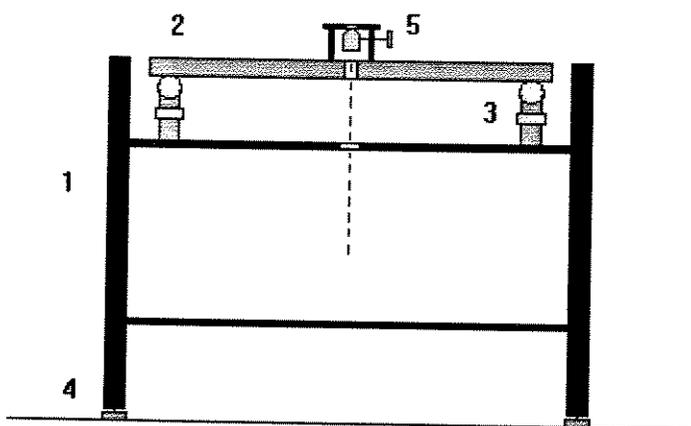


fig. 3.1 - bancada anti-vibração: 1- estrutura metálica; 2 - pedra de granito; 3 - dispositivo regulável com bolas de tênis; 4 - pés vibrastop; 5 - mesa com dispositivo de movimentação da objetiva.

Este aparato mostrou-se capaz de reduzir satisfatoriamente a vibração presente no ambiente, principalmente as vibrações de alta frequência causadas por bombas, motores e aparelhos de ar condicionado.

Sobre o granito aparafusamos uma pequena mesa onde foi fixado um estágio de microscópio e um dispositivo capaz de movimentar com precisão uma lente objetiva. Na direção do eixo óptico da objetiva fizemos, no granito, um furo de 30

mm de diâmetro por onde passamos a tubulação do sistema óptico. Esta tubulação terminava dentro do dispositivo de movimentação da objetiva, mas sem tocar em suas paredes, de modo que não houvesse acoplamento mecânico entre a parte óptica e o sistema granito-estágio-objetiva.

O sistema óptico envolve uma série de componentes, desde a lâmpada até os detectores. Para facilitar sua descrição vamos dividi-lo em partes.

Óptica de Excitação

A função principal desta parte do sistema óptico é iluminar a amostra com a maior quantidade possível de luz de $\lambda \sim 355$ nm.

Normalmente a fonte de luz utilizada em sistemas de fluorescência é uma lâmpada de Mercúrio (ou Xenônio), com potências variando de 70 a 400 W. Optamos por testar uma lâmpada comum, de farol de automóvel, do tipo Halon-Tungstênio, e esta se mostrou bastante satisfatória. Trabalhando a 70 Watts esta lâmpada produz ~ 2.0 W de luz com λ entre 350 e 370 nm, como ilustrado na figura 3.2.

A utilização deste tipo de lâmpada apresenta diversas vantagens com relação às outras:

- custo baixo: ~ 20 vezes menor que a lâmpada de Xenônio (70 W);
- maior robustez;
- alimentação DC, não produzindo ruído na eletrônica;
- disponível em qualquer lojas de auto-peças;
- não coloca em risco a instrumentação eletrônica, como acontece na ignição das lâmpadas de arco.

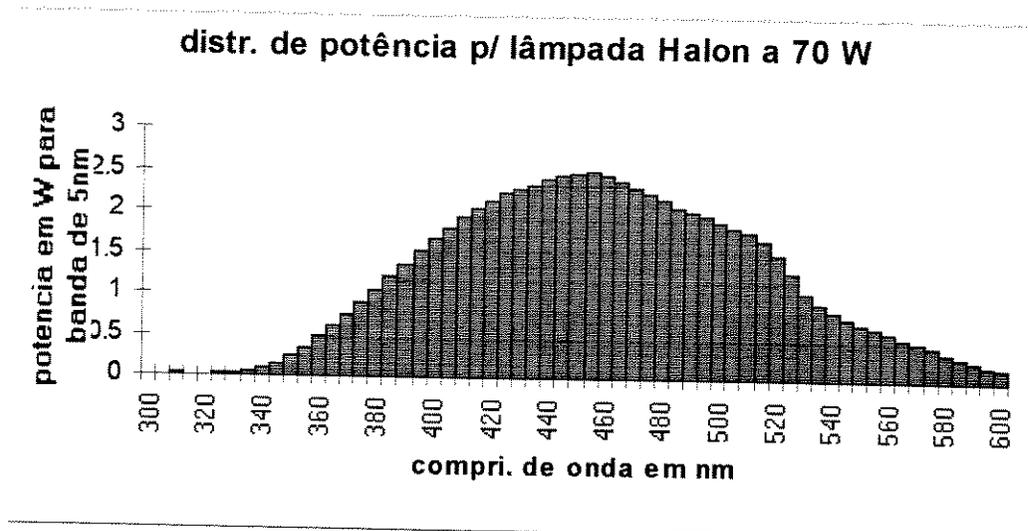


fig. 3.2 - distribuição de potência para a lâmpada Halon-Tungstênio a 70W.

Por outro lado, deve-se verificar que, além de emitir menos em 360 nm do que uma lâmpada de mercúrio de mesma potência, a lâmpada Halon tem a desvantagem de possuir uma área luminosa mais extensa, cerca de 1×5 mm, o que nos obrigou a projetar um sistema óptico com muitos componentes.

Como já mencionado, o projeto foi efetuado levando-se em consideração várias limitações, dentre elas de espaço. Além disso, adotamos a posição de tentar aproveitar ao máximo alguns componentes ópticos já disponíveis, como algumas lentes, filtros e *holders*. Os principais requisitos de projeto que tentamos satisfazer foram:

- facilidade de colocar e retirar o filtro de interferência do eixo óptico de modo a possibilitar iluminação do campo com luz branca;
- inclusão de sistema de resfriamento e ventilação para redução de calor e dispersar o ozônio gerado pela luz ultra-violeta;
- capacidade de diminuição do campo iluminado, através de uma íris manual;
- capacidade de obstrução de toda a luz, através de um obturador.

Uma proposta para o sistema óptico que julgamos razoável (mas não ótima), dadas as condições de contorno, está apresentada na figura 3.3. A lâmpada tungstênio-halogênio se encontra em um tubo acondicionador de alumínio com uma tampa traseira com espaçamento para passagem de ar. Por um pequeno tubo, à frente da lâmpada ar comprimido é admitido para refrigeração do sistema e dissipação do ozônio. Fechando o cilindro acondicionador, pela frente, encontra-se um filtro calorífico que evita que radiação infra-vermelha atinja os componentes ópticos seguintes. Em torno de 360 nm a transmitância deste filtro é de 85%. O tubo acondicionador é separado do restante do sistema por um disco de *nylon* que atua como isolante térmico.

O próximo componente é um condensador (fig. 3.3, item 3), formado por um duplete de lentes com distância focal de 32 mm e diâmetro de 24 mm, espaçadas por 13 mm. A função deste condensador é formar uma imagem reduzida do filamento, que posteriormente será levada até à objetiva.

Para um duplete com lentes iguais, de distâncias focais f e espaçamento entre lentes d , a magnificação M e a distância da imagem à segunda lente s' estão relacionadas à distância do objeto à primeira lente, s , por (Jenkin & White, 1985):

$$s' = [d(s - f) - sf]f / (d - f)(s - f) - sf$$

$$M = f^2 / (d - f)(s - f) - sf$$

A distância entre o filamento e a primeira lente é de 64 mm o que resulta: $M = -0.38$ e $s' = 19.6$. O sinal negativo de M indica que a imagem é formada invertida, o que é irrelevante no presente caso.

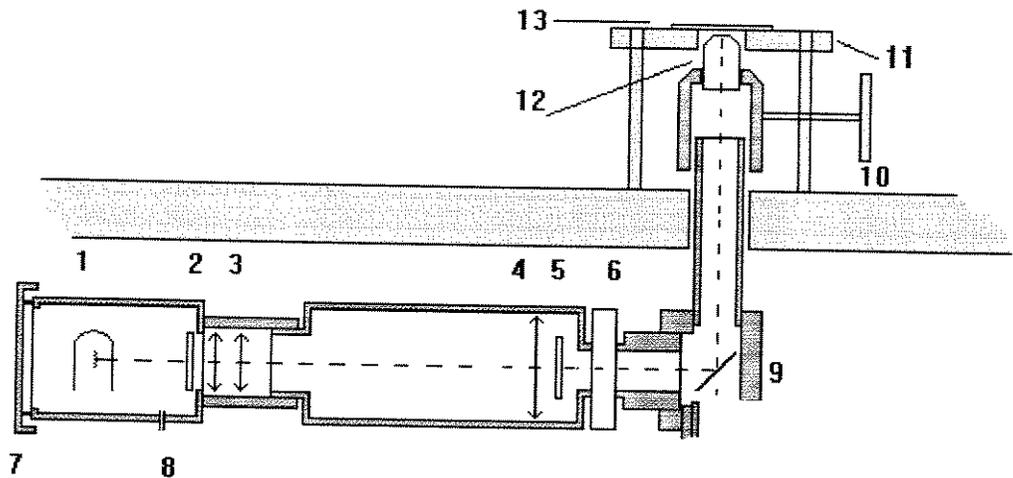


fig. 3.3 - óptica de excitação: 1- lâmpada; 2 - filtro calórico; 3 - duplete condensador; 4 - lente; 5 - filtro de interferência $\lambda = 365\text{nm}$ em suporte removível; 6 - obturador (*shutter*) e íris manual; 7 - tampa traseira com espaçamento para passagem de ar; 8 - entrada de ar; 9 - espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra.

Acoplado ao condensador há um tubo longo onde está posicionada uma lente de $f = 90\text{mm}$ e diâmetro 42mm . Esta lente tem como função coletar a luz da imagem do filamento formada pelo condensador (novo objeto) e formar uma nova imagem no plano da objetiva.

As relações entre a magnificação M , a distância da imagem s' e a distância do objeto s para uma lente simples são dadas por:

$$s' = sf / (s - f)$$

$$M = f / (f - s)$$

Nosso objetivo, como já foi dito acima, é iluminar a amostra com a maior quantidade possível de luz. Queremos no entanto uma iluminação uniforme, ou seja, não devemos formar a imagem do filamento no campo. Projetamos o sistema baseado em observações feitas em microscópios de fluorescência comerciais, onde a imagem

do filamento é formada no lugar onde a amostra é colocada mas sem a presença da objetiva. Para termos um certo ajuste fizemos com que o tubo que suporta a lente pudesse se movimentar dentro do condensador ($\pm 10\text{mm}$) de modo a aumentar ou diminuir s , variando também s' . Na posição central, $s = 120\text{ mm}$ o que nos dá $s' = 360\text{ mm}$ e $M = -3$. O ajuste final foi feito empiricamente.

Após a lente encontra-se o suporte do filtro de excitação. Este filtro tem a função de reduzir a banda passante da luz que vai à amostra para uma faixa de 20nm em torno de 360 nm. Projetamos este componente de modo a poder retirar facilmente o filtro do eixo óptico da montagem, aumentando significativamente a luz que chega à amostra, manobra útil no alinhamento do sistema. Em seguida há um obturador manual que obstrui completamente o feixe de luz e uma íris, também manual, que nos permite controlar a quantidade de luz de excitação. Temos então uma peça que acopla a íris ao cubo do dicróico.

O espelho dicróico é um componente que, sendo posicionado a 45° com relação ao eixo óptico, funciona como espelho para luz com $\lambda < \lambda_c$ e como uma janela para $\lambda > \lambda_c$. Assim, com um dicróico com $\lambda_c = 390\text{ nm}$ podemos refletir a luz de excitação da lâmpada à amostra e simultaneamente transmitir a luz de emissão da amostra aos detetores. Para facilitar o alinhamento do dicróico este foi posicionado sobre um dispositivo ajustável com relação a dois ângulos. Acima do cubo do dicróico foi colocado um tubo que chega até o interior do dispositivo manipulador da objetiva, sem contato com o mesmo, evitando a transmissão de vibrações da estrutura da bancada até o granito.

A seguir estão apresentados os espectros de transmitância de todos os elementos utilizados, exceto das lentes. Estas são feitas de vidro BK7 que tem transmitância constante em torno de 95% até $\lambda \sim 340\text{nm}$.

Na figura 3.4 ilustra-se o espectro de transmitância do filtro calórico. A função deste filtro é evitar que os elementos ópticos seguintes se aqueçam demasiadamente. A sua transmitância em torno de 360 nm é de $\sim 75\%$.

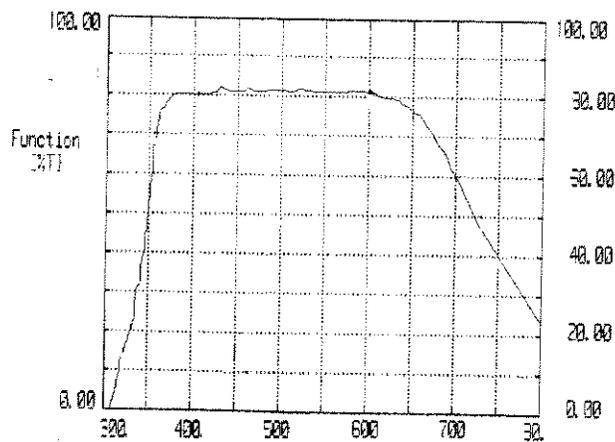


fig. 3.4 - espectro de transmitância do filtro calórico.

Existem disponíveis dois filtros diferentes que podem ser utilizados como filtro de excitação (fig. 3.5 a e b): o primeiro, de interferência, com banda passante de ~ 20 nm e pico de transmitância de 22% em 355 nm; o segundo, com banda passante de ~ 50 nm e pico de transmitância de 60% em 360 nm. A escolha de qual filtro utilizar será feita de acordo com o experimento a ser realizado.

Na figura 3.6 ilustra-se o espectro de transmitância a 45° do espelho dicróico de $\lambda_c = 390\text{nm}$. Como a absorção deste tipo de filtro é mínima, podemos considerar

que toda luz que não é transmitida é refletida, de modo que o espectro de reflexão é simplesmente o complemento do espectro apresentado.

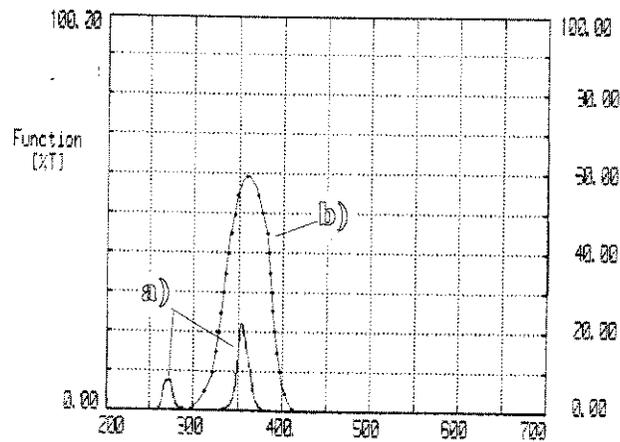


fig. 3.5 - transmitância dos filtros de excitação: a) interferência; b) absorção.

O espectro da luz que efetivamente chega à objetiva é dado pela multiplicação do espectro da lâmpada pelos espectros de transmitância dos filtros calorico e de emissão e reflexão do espelho dicróico.

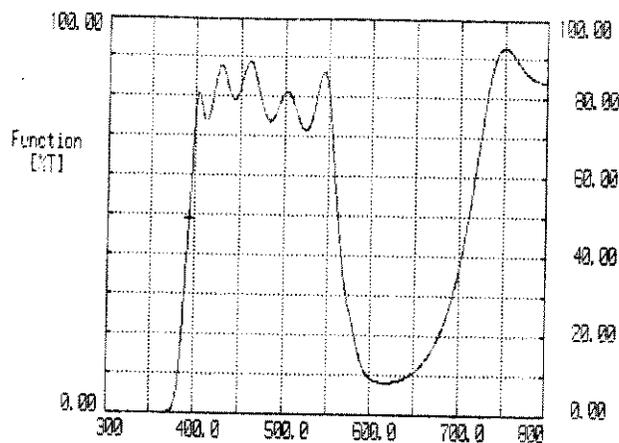


fig. 3.6 - espectro de transmitância a 45° do espelho dicróico de $\lambda_c = 390\text{nm}$

Óptica de Monitoração

Para selecionar, posicionar e posteriormente monitorar a contração da célula, deve-se fazer com que sua imagem chegue a uma câmara de televisão. Como a emissão de fluorescência da célula tem baixa intensidade, é usual iluminar a célula com luz de outro comprimento de onda e separar esta luz da luz de emissão em algum ponto próximo à câmera.

No nosso sistema optamos por iluminar a célula com um LED (*light emitting diode*) de alta luminosidade (75 mW em 660 nm) colocado acima do estágio de microscópio. Este LED, alimentado por uma bateria de 9 V, foi colocado em um suporte móvel e tem sua luz condensada e focalizada por uma lente. A intensidade desta luz pode ainda ser controlada por um potenciômetro.

A posição e tamanho da imagem formada por uma objetiva depende de algumas de suas características como distância focal (f), e magnificação (M), mas podem ser alterados pela distância de trabalho utilizada ($w.d.$). Isto nos permite obter diferentes campos de visão com a mesma objetiva, modificando-se a $w.d.$ e as outras distâncias ópticas envolvidas. Esta possibilidade nos pareceu bastante atraente pois, além de podermos monitorar células de animais adultos ($\sim 120\mu\text{m}$ de comprimento) havia a possibilidade de observarmos células de animais neonatos ($\sim 20\mu\text{m}$ de comprimento). A opção por fazer um sistema mais versátil que os comerciais trouxe algumas dificuldades adicionais para o projeto óptico, que se encontra esquematizado na figura 3.7.

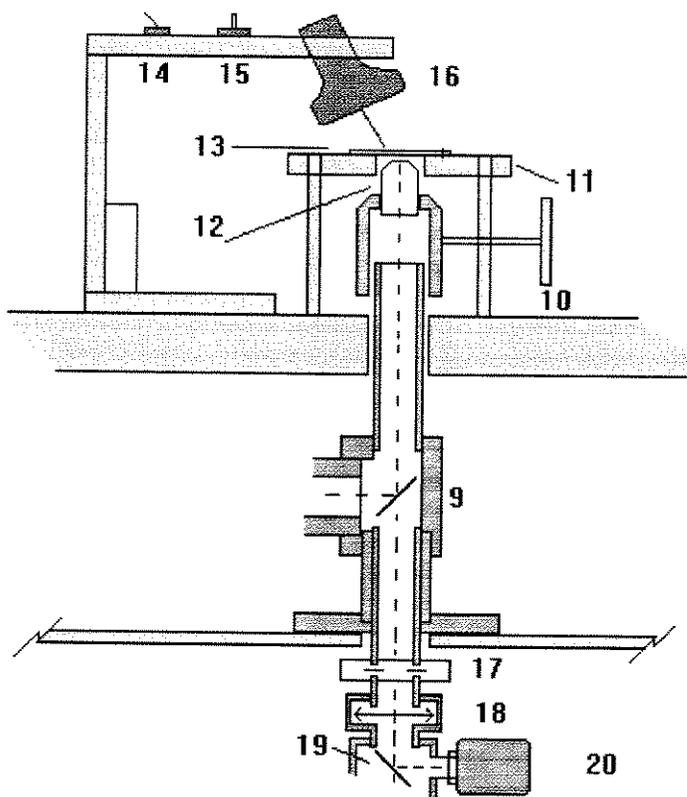


fig. 3.7- óptica de monitoração: 9 - espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra ; 14 chave liga desliga; 15 - potenciômetro; 16 - LED com lente focalizadora; - 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho, RRM; 20 - câmera de T.V. tipo CCD.

Basicamente a monitoração é feita da seguinte forma: ajustando a w.d. da objetiva fazemos com que a imagem da amostra iluminada com a luz do LED seja formada a aproximadamente 300mm do porta amostras, no plano onde se encontram as fendas ajustáveis. Estas fendas tem abertura máxima de 12 mm, podendo ser controladas manualmente, formando campos quadrados ou retangulares até a obstrução total do feixe. É importante que a imagem seja formada no plano das fendas

para que se possa limpar a imagem obtida, bloqueando a luz vinda de outras células, da câmara de perfusão e da solução.

Com as fendas totalmente abertas o campo de visão é , nesta posição, de aproximadamente $150\mu\text{m} \times 110\mu\text{m}$. Este campo é suficiente para que se possa enxergar integralmente a grande maioria das células cardíacas de mamíferos adultos.

A imagem formada pela objetiva é então usada como objeto para uma outra lente posicionada abaixo das fendas. Esta última, forma sua imagem sobre o sensor de uma câmara tipo CCD de 1/3" (área sensível de $4.2 \times 3.1 \text{ mm}$). Pode-se determinar o campo visto no monitor de vídeo por:

$$\text{campo de visão} = \text{dimensões do sensor} / \text{magnificação total}$$

Entre a lente e o sensor está colocado um espelho refletor de vermelho (RRM) que, além de refletir mais de 99% da luz com $\lambda \sim 660\text{nm}$, transmite em média 75% da luz na faixa entre 400 e 420 nm e 85% da luz na faixa entre 480 e 500 nm (fig. 3.8), possibilitando assim que a fluorescência chegue aos detetores sem grande atenuação.

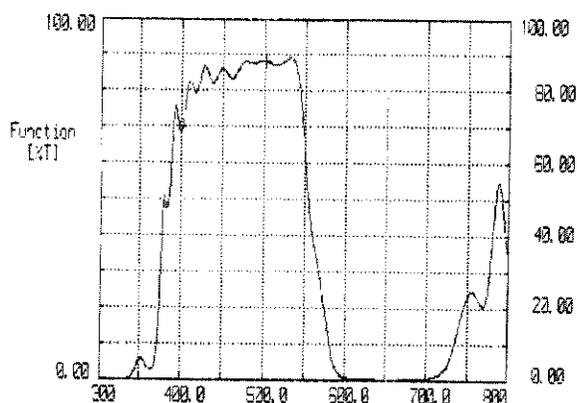


fig. 3.8- espectro de transmitância a 45° do espelho refletor de vermelho.

Para se obter magnificação maior, ou seja, diminuição do campo de visão, fazemos o seguinte procedimento: aproximamos a objetiva da amostra, fazendo com que a sua imagem se forme a uma distância maior que 300mm. Rosqueando o tubo que se encontra acima das fendas aumentamos a distância entre a fenda e a objetiva de modo que a imagem continue sendo formada no plano daquelas. Rosqueando o tubo que se encontra abaixo das fendas diminuimos a distância entre esta e a lente, aumentando ainda mais a magnificação. Finalmente deslocamos a câmara CCD para trás conseguindo uma imagem em foco.

Óptica de Detecção

A função deste sub-sistema é coletar a luz emitida pelo indicador fluorescente que se encontra dentro da célula e levá-la, com a menor perda possível até os fotodetetores. Grande parte dos componentes ópticos utilizados para tal são também utilizados na parte de monitoração. Assim, fomos obrigados a trabalhar com a imagem formada nas fendas. A figura 3.9 mostra esquematicamente como a luz de emissão é dirigida até os fotodetetores.

A imagem formada pela objetiva no plano das fendas é composta por luz vermelha, vinda do LED, e luz na faixa entre 400 e 500 nm, emitida pelo indicador fluorescente que se encontra dentro da célula. O RRM separa estas duas faixas refletindo $\lambda = 660\text{nm}$ para a câmara CCD e transmitindo a luz de 400 e 500 nm.

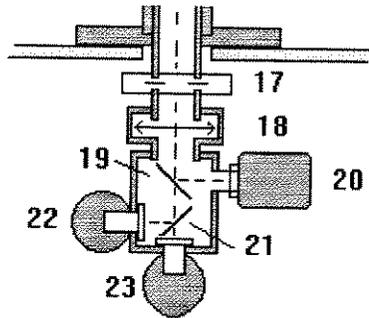


fig. 3.9 - óptica de detecção: 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho RRM; 20 - câmera de T.V. tipo CCD; 21 - espelho dicróico $\lambda = 445$ nm; 22 - PMT com filtro $\lambda = 405$; 23 - PMT com filtro $\lambda = 485$.

Para que se possa utilizar o método da razão a luz de emissão deve ser dividida de modo que os sinais em dois comprimentos de onda diferentes possam ser registrados, de preferência um de cada lado do ponto isobéptico. Isto é conseguido com o espelho dicróico $\lambda = 450$ nm (figura 3.10), que tem refletividade em torno de 95% para luz na faixa entre 380 e 430 nm e transmitância média de 70% entre 475 e 500nm . Na entrada de cada fotomultiplicadora (PMT, fig. 3.9, itens 22 e 23) encontra-se um filtro para minimizar sinais espúrios e estreitar a banda passante do sinal luminoso. Na entrada da PMT que recebe o sinal transmitido pelo dicróico 450nm, encontra-se instalado um filtro de interferência com λ igual a 495 ± 10 nm. Na outra PMT o filtro, também de interferência, possui λ de 410 ± 20 nm (figs. 3.11 e 3.12).

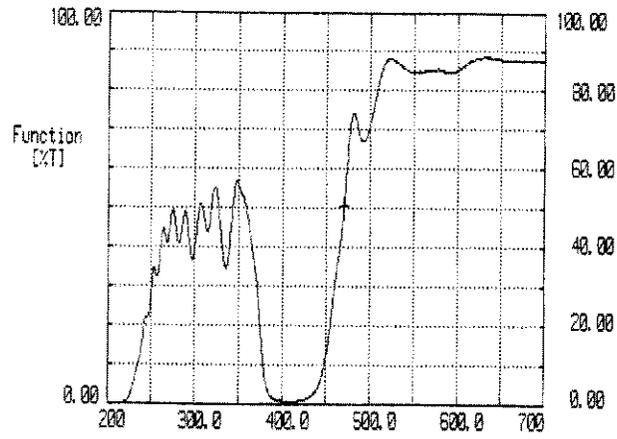


fig. 3.10 - espectro de transmitância a 45° para o dicróico $\lambda_c = 450\text{nm}$.

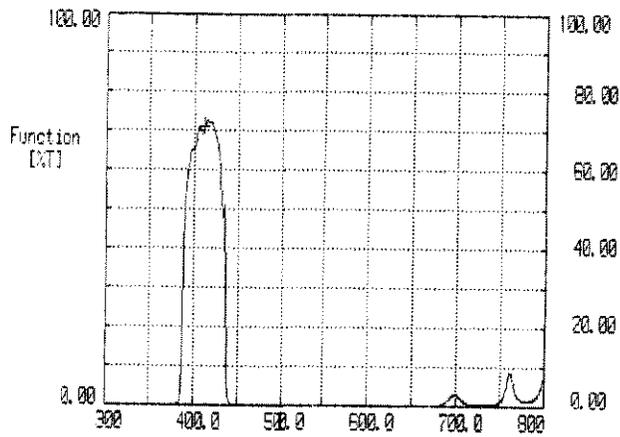


fig. 3.11- espectro de transmitância do filtro de interferência $\lambda = 410\text{ nm}$.

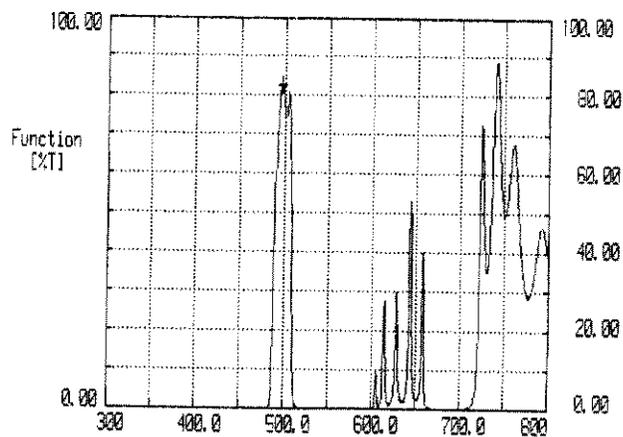


fig. 3.12 - espectro de transmitância do filtro de interferência $\lambda = 495\text{ nm}$.

Um desenho completo do sistema óptico, integrando os sub-sistemas descritos anteriormente, é apresentado na figura 3.13.

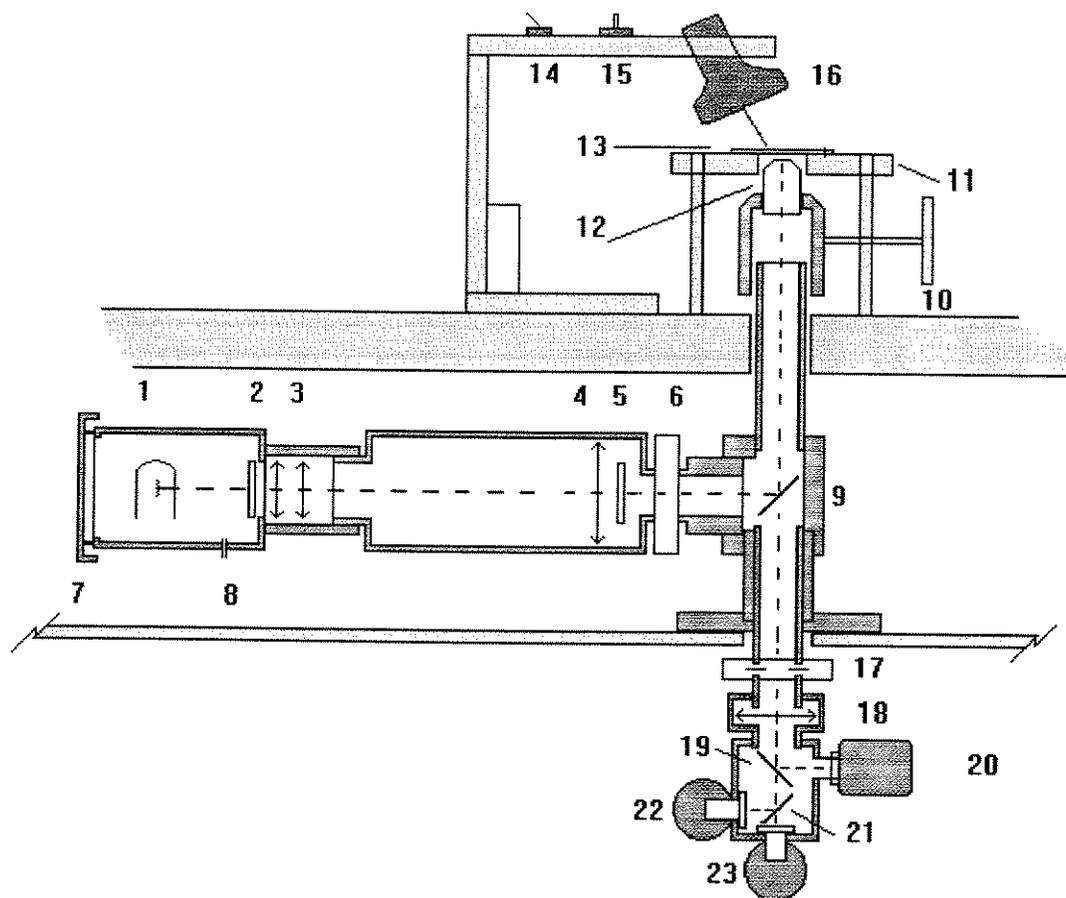


fig. 3.13 - vista global do sistema óptico: 1- lâmpada; 2 - filtro calórico; 3 - duplete condensador; 4 - lente; 5 - filtro de interferência $\lambda = 365\text{nm}$ em suporte removível; 6 - shutter rápido e íris manual; 7 - tampa traseira com espaçamento para passagem de ar; 8 - entrada de ar; 9 - espelho dicróico $\lambda = 385\text{nm}$; 10 - dispositivo para movimentação da objetiva; 11 - estágio de microscópio; 12 - objetiva 40x ; 13 - porta amostra. 14 - chave liga-desliga; 15 - potenciômetro; 16 - LED com lente focalizadora; - 17 - fendas ajustáveis; 18 - lente convergente; 19 - espelho refletor de vermelho; 20 - câmera de T.V. tipo CCD; 21 - espelho dicróico $\lambda = 445\text{ nm}$; 22 - foto-multiplicadora com filtro $\lambda = 405$; 23 - foto-multiplicadora com filtro $\lambda = 485$.

3.2 - Eletrônica

Os fotosensores

Dentre os possíveis dispositivos fotosensíveis existentes no mercado optamos por trabalhar com fotomultiplicadoras (PMT's), por serem tradicionalmente os dispositivos mais empregados na área de microscopia de fluorescência. Um tubo fotomultiplicador típico consiste de um catodo foto-emissivo, seguido por eletrodos de focalização, um multiplicador de elétrons e um anodo coletor de elétrons, todos os elementos envolvidos em um tubo a vácuo (fig. 3.14).

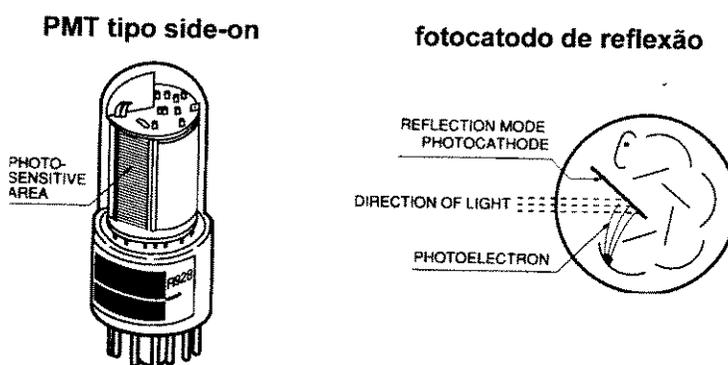


fig. 3.14 - tubo foto multiplicador tipo *side-on* e foto-catodo de reflexão.

Quando a luz atinge o fotocátodo, este emite elétrons no vácuo por efeito fotoelétrico clássico. Estes fotoelétrons são então dirigidos pelos eletrodos de focalização até o multiplicador de elétrons, onde ocorre o processo de emissão secundária. Os elétrons secundários são coletados pelo anodo, gerando o sinal de saída da PMT.

Por causa da multiplicação dos elétrons causada pelo fenômeno da emissão secundária, as PMT's exibem alta sensibilidade e, tomando-se as precauções corretas, baixo ruído na faixa do ultra-violeta, visível e infra-vermelho próximo.

Existem diversos fabricantes de PMT's e cada um deles produz vários modelos diferentes. Optamos pelo modelo R4220 fabricado pela Hamamatsu Photonics. Esta é uma PMT do tipo *side-on*, de alta sensibilidade, custo relativo baixo e frequentemente utilizada em microscopia de fluorescência. Este dispositivo possui um fotocatodo opaco de material bialcalino que trabalha no modo de reflexão e um multiplicador de elétrons com estrutura tipo *circular-cage* com 9 estágios de eletrodos (chamados dinodos).

O fotocatodo de uma PMT utiliza a energia da luz nela incidente para liberar fotoelétrons. A eficiência de conversão, ou *photocathode sensitivity*, é uma função do comprimento de onda da luz incidente, função esta normalmente chamada de resposta espectral. A curva de resposta espectral é dominada no lado de comprimentos de onda grandes pelas características de material do catodo. No outro extremo, comprimentos de onda curtos, o determinante é o envólucro de vidro da PMT. O modelo escolhido possui catodo de material bi-alkalino e janela de vidro que transmite UV fazendo com que a curva de resposta espectral se estenda do ultra violeta ao visível com cortes em 185 e 710 nm (fig. 3.15).

A resposta espectral é expressa em termos da sensibilidade radiante (S) em função do comprimento de onda, sendo S (Ampere/Watt, A/W) a corrente de fotoelétrons que sai do catodo, dividida pela potência radiante incidente na PMT, em um dado λ .

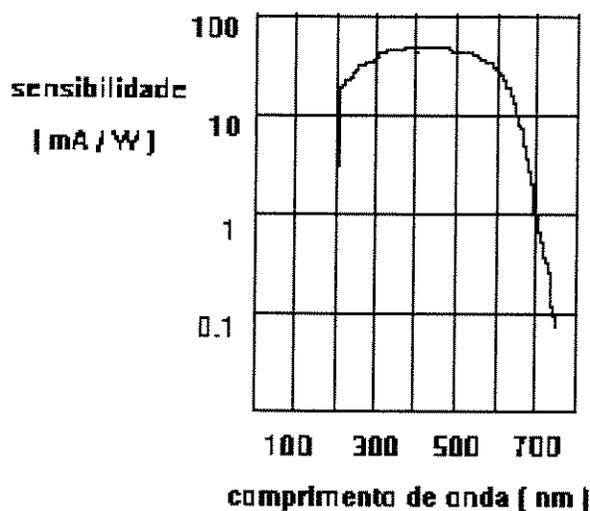


fig. 3.15 - resposta espectral da PMT modelo R4220 (Modificado da especificação fornecida por Hamamatsu Photonics, Japão).

Os foto-elétrons emitidos do catodo são acelerados por um campo elétrico até colidirem com o primeiro dinodo do multiplicador de elétrons. Ao se chocarem ao dinodo estes produzem elétrons secundários. Estes elétrons secundários são então acelerados até o próximo dinodo e repetindo o mesmo processo várias vezes obtemos uma alta amplificação de corrente. Uma pequena corrente de fotoelétrons no catodo pode ser observada como uma alta corrente de saída da PMT.

A amplificação de corrente é simplesmente a razão entre a corrente de saída, ou corrente do anodo, e a corrente de fotoelétrons do catodo. Para a PMT escolhida o valor típico de amplificação de corrente é 1.2×10^7 . A emissão de elétrons secundários por um dinodo depende fortemente do campo elétrico presente entre eles, ou seja, em última instância, da tensão de alimentação da PMT. Assim, o sinal de saída da PMT é extremamente sensível a flutuações na fonte de alta tensão. Assim, esta fonte deve ser o mais estável possível.

Uma das características principais de uma PMT é sua “corrente escura” (*dark current*). Esta é a corrente que flui pelo anodo quando a PMT está sendo operada em completa escuridão. A corrente escura e o ruído por ela introduzido são fatores críticos na determinação da aplicabilidade de uma PMT em um certo experimento. As principais fontes de corrente escura são: emissão termoiônica de elétrons; ionização de gases residuais da PMT; corrente de fuga pelos isolantes; emissão de elétrons devido ao campo. Seja qual for a origem desta corrente o seu efeito será maior quanto maior for a tensão de alimentação. Assim os fabricantes aconselham a se trabalhar em uma tensão 20 a 30 % menor que a tensão máxima.

Eletrônica associada às PMT's.

A alimentação de uma PMT deve ser feita com uma fonte de alta tensão (~1000 volts) e um divisor que distribui esta tensão pelos dinodos. Optamos por adquirir junto com as duas PMT's os socketes acoplados com divisores de tensão (modelo E717-21) e as fontes de HV (modelo C6260), também fabricados pela Hamamatsu .

A alimentação da fonte de HV é feita simplesmente com uma tensão de 15 volts. A tensão gerada por ela pode ser variada de 0 a 1250 Volts ajustando-se um potenciômetro externo como é mostrado na figura 3.16.

A saída de uma PMT é um sinal de corrente que dentro de determinada faixa é linear com a intensidade de luz nela incidente. Como as PMT's são normalmente acopladas a dispositivos que usam tensão como sinal de entrada (registradores, polígrafos, microcomputadores) é necessário fazer a conversão corrente/tensão antes de qualquer ligação.

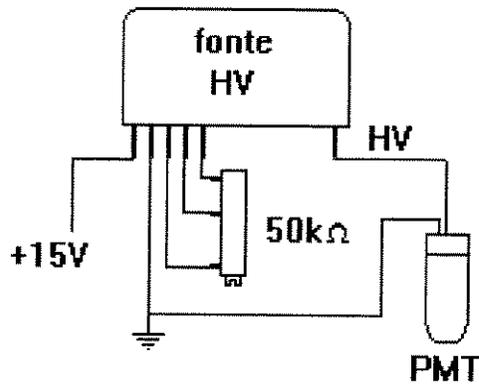


fig. 3.16 - esquema de alimentação da PMT.

A princípio uma PMT é uma fonte de corrente ideal, logo esta conversão poderia ser feita simplesmente com uma resistência de carga. Com uma fonte ideal podemos obter qualquer tensão de saída aumentando-se a resistência. Na prática, o que se observa é que, se utilizarmos resistências acima de um certo valor, deterioramos a linearidade do sinal de saída com relação à corrente.

Uma maneira simples de fazer a conversão corrente/tensão evitando o problema acima é utilizar-se de um amplificador operacional como no circuito mostrado na figura 3.17. Para este circuito temos a tensão de saída : $V_0 = -I_p \times R_f$.

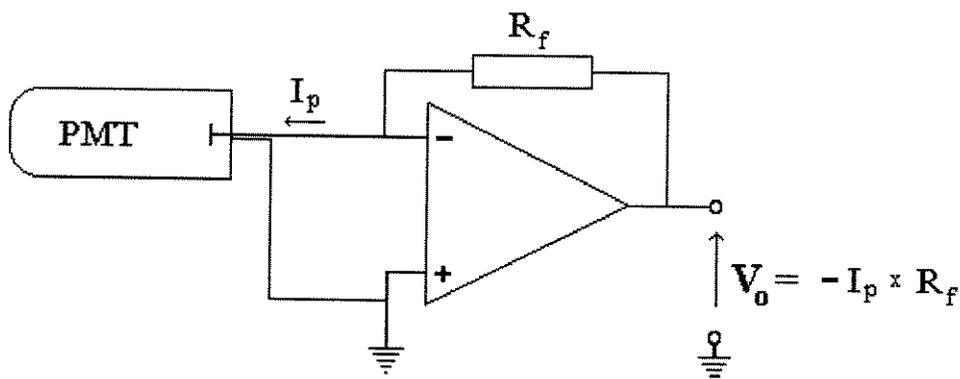


fig. 3.17 - circuito do conversor corrente / tensão.

No nosso caso estamos interessados em detectar correntes entre 0.1 nA (corrente no escuro das PMT's) e 1 μ A , que inclui com folga, a faixa de corrente típica correspondente a transientes de cálcio em células cardíacas, estimada a partir de dados obtidos em outros equipamentos. Pensando em um futuro sistema computadorizado de aquisição de dados definimos que o valor máximo de tensão de saída para o nosso sistema deveria ser de 5 Volts, valor normalmente utilizado em conversores analógico/digitais. Para obtermos uma tensão de saída de 5 Volts em 1 μ A devemos utilizar uma resistência $R_f = 5$ M Ω . O amplificador operacional utilizado foi o LF 351 com entrada com transistor FET.

O circuito final com a eletrônica associada às PMT's é apresentado na figura 3.18.

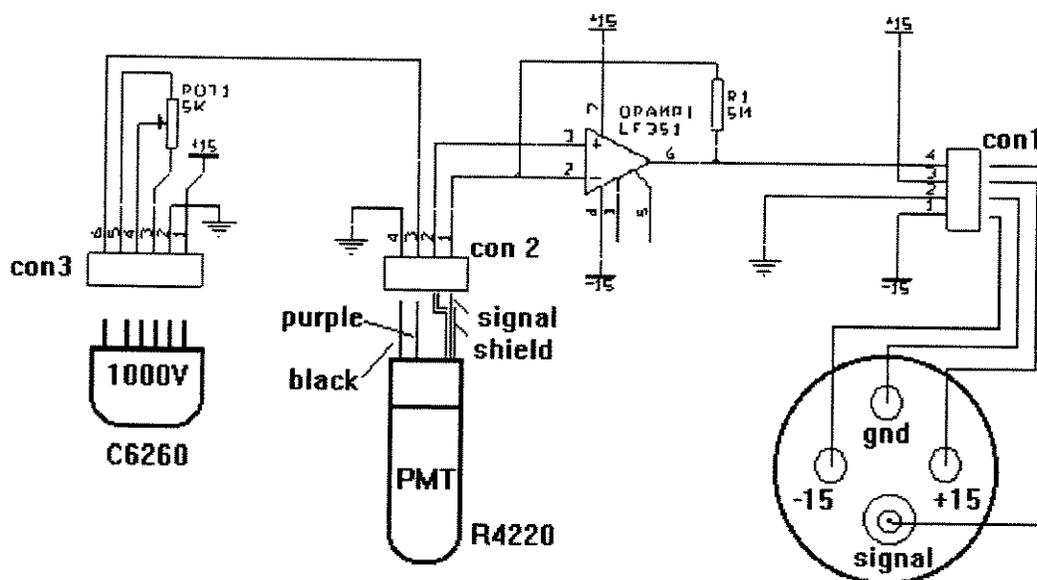


fig. 3.18 - circuito eletrônico associado às PMT's.

Filtros

O sinal de interesse (transiente de cálcio, R) possui tipicamente a forma de onda apresentada na figura 3.19. A figura 3.20 ilustra o espectro de frequência deste sinal, obtido a partir da transformada de Fourier.

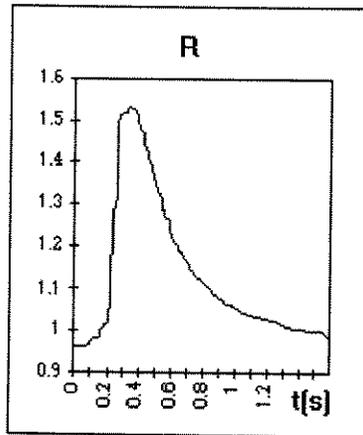


fig 3.19 - R medido durante um transiente típico estimulado por campo (modificado de Spurgeon et al., 1990).

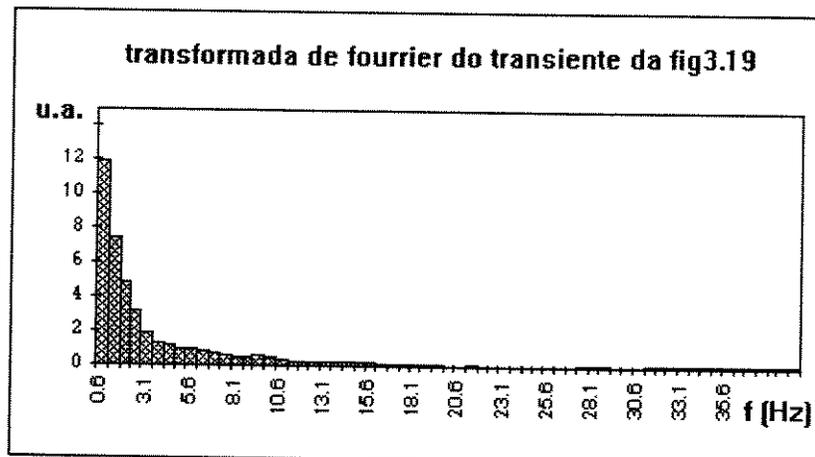


fig 3.20 - transformada de Fourier do transiente mostrado na figura 3.19.

Podemos observar que, para este transiente, as componentes com frequências acima de 20Hz tem amplitudes muito pequenas comparadas com aquelas de frequência abaixo de 12Hz . Desta forma desenvolvemos filtros com frequência de corte em 25Hz, Butterworth, com oito polos, de modo a cortar agudamente todas as frequências que não nos interessam (Horowitz, 1994).

A curva de resposta em frequência do filtro é apresentada na figura 3.21 .

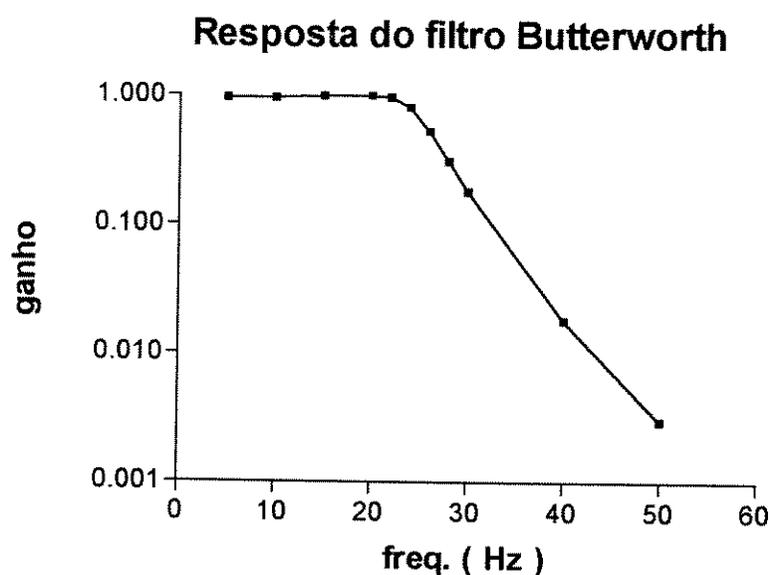


fig. 3.21. - curva de resposta em frequência para os filtros construídos.

Aquisição do sinal

Uma vez filtrado o sinal das PMT tínhamos que decidir como registrá-los de maneira adequada para processamento e análise. Optamos por adquirir no mercado nacional uma placa de conversão A/D (CAD 12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP) e um *software* para aquisição de dados (AqDados, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP).

As características principais da placa de conversão CAD12/36 são listadas abaixo:

- conversor A/D de 12 bits de resolução;
- 16 entradas analógicas simples ou 8 diferenciais multiplexadas;
- 16 entradas digitais;
- 16 saídas digitais;
- suporte para interrupções;
- base de tempo interna de 2MHz;
- suporte para DMA.

Divisor de sinal

Como o *software* de aquisição de dados não permitia que fizéssemos operações simples como a divisão de um sinal por um outro, resolvemos construir um circuito eletrônico que fizesse esta operação com os sinais analógicos e adquirir sua saída no canal zero.

O Divisor de sinais é um circuito cuja função é realizar a divisão entre dois sinais positivos, variáveis ou não (E_1 e E_3) e multiplicar o resultado por um terceiro sinal positivo, E_2 .

O princípio de funcionamento do circuito baseia-se na seguinte propriedade da função logarítmica: $\log a + \log b - \log c = \log a*b/c = k$

Fazendo-se o antilog de k , obtém-se ab/c . Assim, para efetuar $(E_1 \times E_2)/E_3$, o circuito efetua o logaritmo de E_1 (bloco 1), adiciona este resultado ao logaritmo de E_2 (bloco 2), subtrai este valor do logaritmo de E_3 (bloco 3) e o antilog deste sinal é efetuado no bloco 4, conforme diagrama em blocos (fig. 3.22).

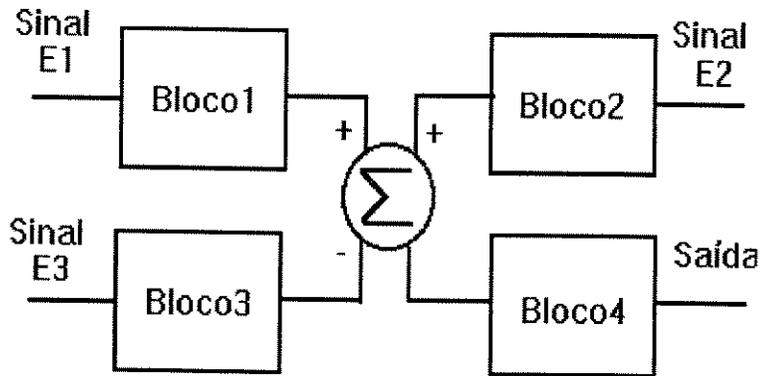


fig 3.22 - diagrama de blocos do circuito divisor de sinais.

Os blocos 1, 2 e 3 utilizam os chamados amplificadores logarítmicos para efetuar o logaritmo da tensão de entrada. Estes circuitos utilizam um transistor na malha de realimentação do amplificador operacional (Amp. Op.). A relação entre a corrente de coletor e a tensão base-emissor para um transistor é tipicamente logarítmica numa faixa que se estende desde alguns picoampères até alguns miliampères.

Quando introduzimos na malha de realimentação do Amp. Op. um transistor na configuração base-comum, obtemos então o circuito logarítmico, representado na figura 3.23.

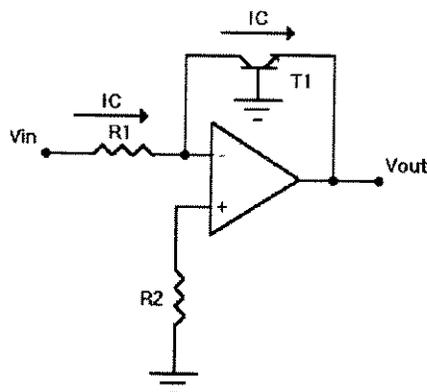


fig 3.23 - circuito logarítmico: $V_{out} = \ln V_{in}$

O Bloco 4 utiliza um amplificador antilog para fazer o antilog do sinal de entrada. O amplificador antilog é um circuito semelhante ao amplificador log, com a única diferença de possuir o resistor e o transistor com suas posições invertidas. O circuito antilog pode ser visto na fig. 3.24 :

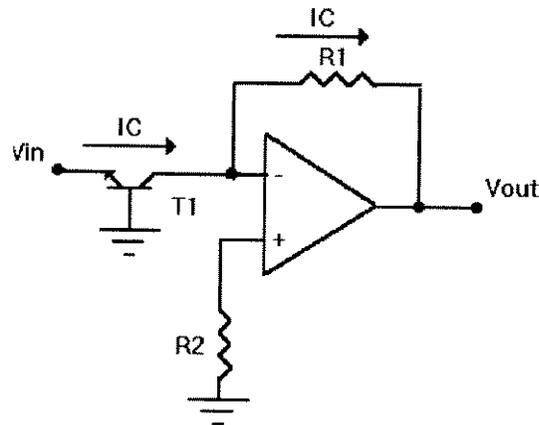


fig 3.24 - circuito antilog: $V_{out} = e^{V_{in}}$

Outros equipamentos que formam o setup

Nesta secção descreveremos outros equipamentos que fazem parte sistema:

- fonte da lâmpada: fonte estabilizada digital modelo ETB-2248D (Entelbra, Londrina, PR), tensão de saída ajustável de 0.1 a 30 Volts e corrente máxima de 6A.
- fonte de alimentação dos filtros, divisor e estimulador: igual a anterior.
- câmera e monitor de TV: modelo OSL-100 da CCD Observation System, com sensor CCD de 1/3" , sensibilidade até 1 lux, utilizada em sistemas de segurança.
- vídeo cassete: modelo VC-1494B (Sharp).

3.3 - Estimativa dos custos

Fazemos abaixo uma estimativa grosseira dos custos do conjunto experimental desenvolvido.

| Ítems | valor em US\$ |
|--|-----------------|
| - PMT's, soquetes, shields magnéticos e fontes de alta tensão..... | 2,000 |
| - fitros de interferência e dicróicos | 1,000 |
| - objetiva e estágio de microscópio | 1,000 |
| - lentes, shutter, fendas e outros componentes ópticos de menor valor..... | 1,000 |
| - fontes da lâmpada e de alimentação da eletrônica das PMT's..... | 2,000 |
| - câmera e monitor de TV | 1,500 |
| - vídeo cassete | 500 |
| - bancada anti-vibração | 500 |
| - tubulação e suportes da óptica..... | 1,000 |
| - outros circuitos eletrônicos menores..... | 500 |
| - TOTAL | ~ 11,000 |

Um sistema completo para se fazer microscopia de fluorescência em células isoladas pode ser adquirido por aproximadamente US\$ 50,000 (FOB).

Capítulo 4

Testes de Bancada

O objetivo deste capítulo é avaliar, do ponto de vista da Engenharia, o sistema de microscopia construído.

Após a montagem mecânica começamos a fazer os ajustes na eletrônica. O primeiro problema encontrado foi o excesso de ruído, principalmente em altas frequências. Uma das principais fontes de ruído era a fonte de 1000 Volts das PMT's. Minimizamos este problema separando os reguladores de tensão das PMT's do regulador de tensão dos filtros. Houve necessidade de separá-los fisicamente, alimentando-os com fontes diferentes. Obtivemos ao final das modificações um sinal de tensão com a fenda das PMT's fechada (corrente escura) com um ruído menor que 10 mV. Através do ajuste de *offset* dos filtros o sinal, nesta condição, foi ajustado em zero volts.

Tipicamente o sistema se estabiliza em um período de 10 a 15 minutos devido principalmente ao iluminador (tempo de aquecimento da lâmpada e das peças em sua volta).

4.1 - Teste do Iluminador

Um ponto crucial em um sistema de fluorescência é seu iluminador. Este conjunto de componentes ópticos, descrito no item 3.1 (Óptica de Excitação), tem como função fornecer à amostra a luz necessária para a excitação da molécula fluorescente. É desejado que o iluminador possua as seguintes características:

- Comprimento de onda e banda passante adequada ao indicador usado: o filtro (ou monocromador) utilizado deve ser escolhido de forma a minimizar fluorescências espúrias e também evitar proximidade com os comprimentos de onda dos filtros de emissão.
- Estabilidade: a intensidade da luz de excitação não deve variar nem em altas frequências (gerando ruído nos sinais coletados pelas PMT) nem em baixas (fazendo com que a intensidade média varie). Apesar do método da razão minimizar o efeito da falta de estabilidade até certo ponto, estas variações perturbam o andamento do trabalho durante a coleta de dados. Como trabalhamos com amostras vivas, qualquer variação nas intensidades registradas pode ser encarada como deteriorização da condição da célula ou do indicador.
- Potência: como células cardíacas isoladas têm espessura da ordem de micrômetros, a absorção total de luz é muito pequena. A razão entre a luz absorvida e a luz incidente pode ser deduzida a partir das expressões encontradas no item 2 (Eq. 2.3):

$$I_{ab} / I_i = \epsilon \delta c$$

onde c e ϵ são respectivamente a concentração ($\sim 50 \mu\text{M}$, Berlin et al., 1994) e o coeficiente de extinção da substância fluorescente ($\sim 34 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, Grynkiewicz et al., 1985) e δ a espessura da amostra ($10 \mu\text{m}$, Hiroshi et al., 1996):

$$I_{\text{ab}} / I_0 \sim 1,7 \times 10^{-3}$$

Assim, é necessário que o iluminador forneça luz suficiente para que a pequena parcela de luz absorvida resulte em intensidade emitida detectável pelas PMT's.

Para teste dos dois últimos pontos foi necessário um fotômetro sensível à luz com comprimento de onda da ordem de 350nm . Não foi possível encontrar no mercado um fotômetro apropriado e portanto resolvemos construir um protótipo, a partir de um fotodiodo com resposta à radiação ultra-violeta.

O corpo do sensor foi projetado de maneira a facilitar seu posicionamento no estágio, sobre a objetiva, sendo facilmente alinhado no eixo óptico do sistema. Infelizmente, devido a um espaçamento existente entre a superfície ativa do sensor e a sua janela de proteção não foi possível fazer com que toda a luz transmitida pela objetiva chegasse ao sensor. Contudo, tanto para se observar a estabilidade do iluminador quanto para se comparar a intensidade de luz fornecida pelo sistema com a de um sistema comercial este fato não se apresenta relevante. Para se estimar a quantidade de luz total fornecida devemos usar os valores apresentados na figura 4.1. Assim, a área iluminada pela luz UV que vem da objetiva é:

$$A_i \sim \pi (4 \times \text{tg } 40,5)^2 \sim 36\text{mm}^2$$

Como a área do sensor é de apenas 5.1 mm^2 multiplica-se o valor medido por 7 ($\sim 36\text{mm}^2 / 5.1 \text{ mm}^2$) para se obter a intensidade total de luz incidente.

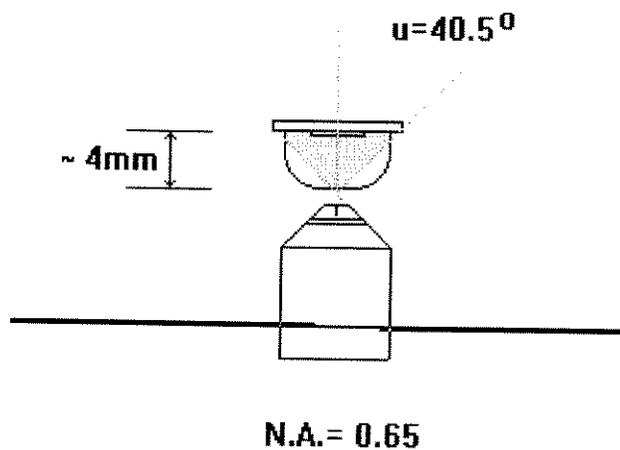


fig. 4.1 - Geometria da montagem para medição da intensidade da luz de excitação.

A figura 4.2 ilustra a tensão de saída do fotômetro para diversas potências da lâmpada do iluminador. Podemos observar que para a potência máxima o ruído é de $\sim 2\%$. Como o ruído se mantém independente da potência da lâmpada provavelmente parte dele é gerado não pelo iluminador em si mas sim pelo fotômetro utilizado.

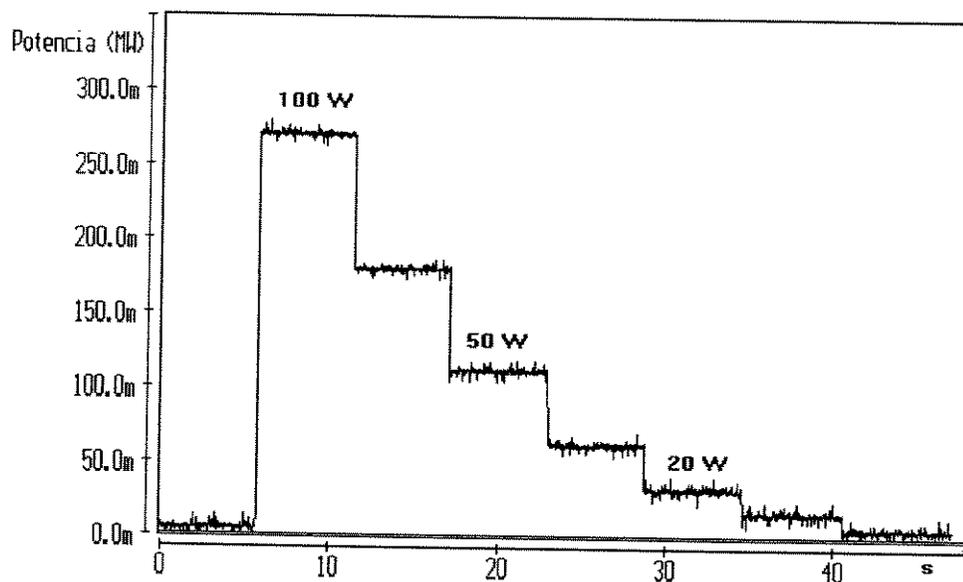


fig 4.2 - intensidade de luz ultra-violeta medida em função da potência da lâmpada.

Segundo as equações desenvolvidas neste trabalho (capítulo 2) a razão das fluorescências medidas, nos dois canais, independe da intensidade da luz de excitação. Para testarmos esta afirmação foi colocada sobre a objetiva uma amostra fluorescente, a água tônica comercial (que contém quinino, substância usada como padrão de fluorescência), e variamos a potência do iluminador registrando simultaneamente a razão. O resultado é ilustrado na figura 4.3. Pode-se observar que apesar da relação sinal ruído ficar cada vez menor, o valor médio da razão se mantém constante até intensidades de luz de excitação da ordem de 30% do valor máximo. Ou seja, como esperávamos, a diminuição da intensidade de luz diminui a precisão das medidas mas não sua acurácia.

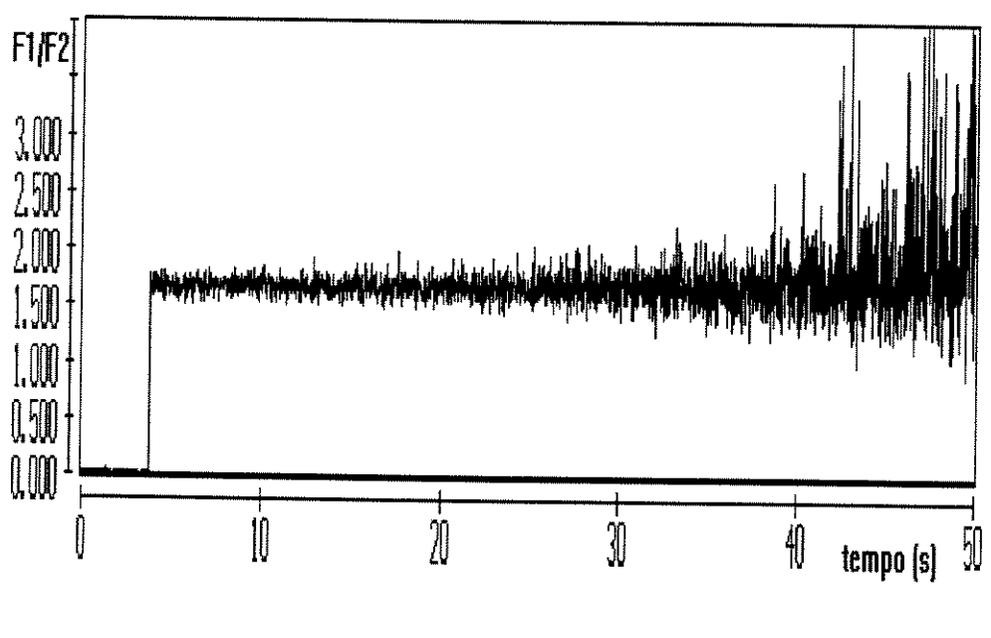


fig 4.3- razão de fluorescência ($F1/F2$) para diferentes intensidades de luz de excitação. Em $t = 40s$ a potência da lâmpada é aproximadamente 30% da inicial.

4.2 - Linearidade do Sistema de Detecção

O objetivo deste teste foi determinar se cada conjunto PMT, Conversor I/V e Filtro de Sinal tinha uma resposta linear em relação à intensidade de luz incidente nas PMT's. Utilizamos então uma série de filtros ópticos de espectros conhecidos para atenuar a luz gerada por uma fonte fixa e registramos o sinal de saída do conjunto. O espectro de cada um destes filtros é mostrado na figura 4.4 abaixo.

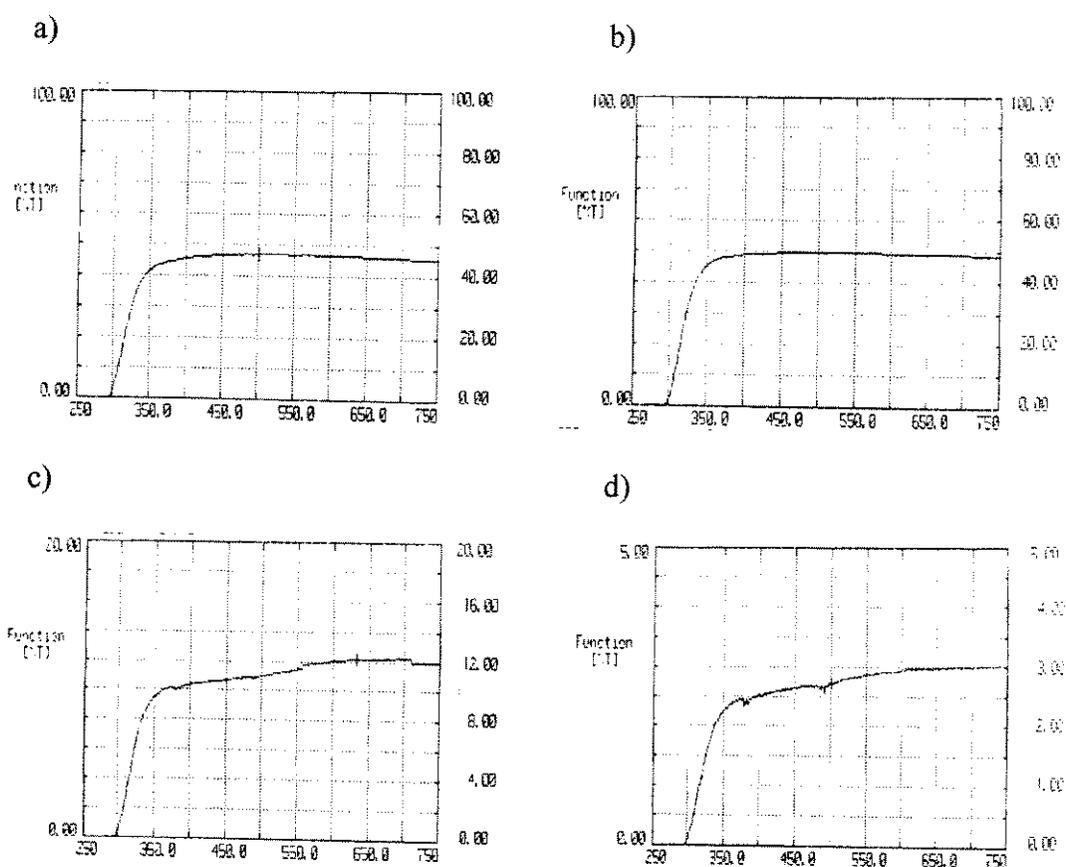


fig 4.4 - curvas de transmitância dos filtros de densidade. Valores de transmitâncias nominais: a) e b) 50 % para ambos; c) 12% e d) 3 %.

Posicionamos uma fonte de luz no eixo óptico do sistema, acima da objetiva, usando um pé pesado para sustentá-la. Ajustamos a posição desta fonte e a abertura das fendas de modo a obter uma luminosidade tal que para cada canal (canal-1, $\lambda = 410\text{nm}$, azul; canal-2, $\lambda = 495\text{nm}$, verde) tivéssemos um sinal de ~ 5 Volts. Colocando os filtros sequencialmente (conforme coluna 1 da tabela 4.1) obtivemos registros como os mostrados na figura 4.5. Para cada canal obtivemos 10 registros abrangendo uma faixa dinâmica de $\sim 10^3$.

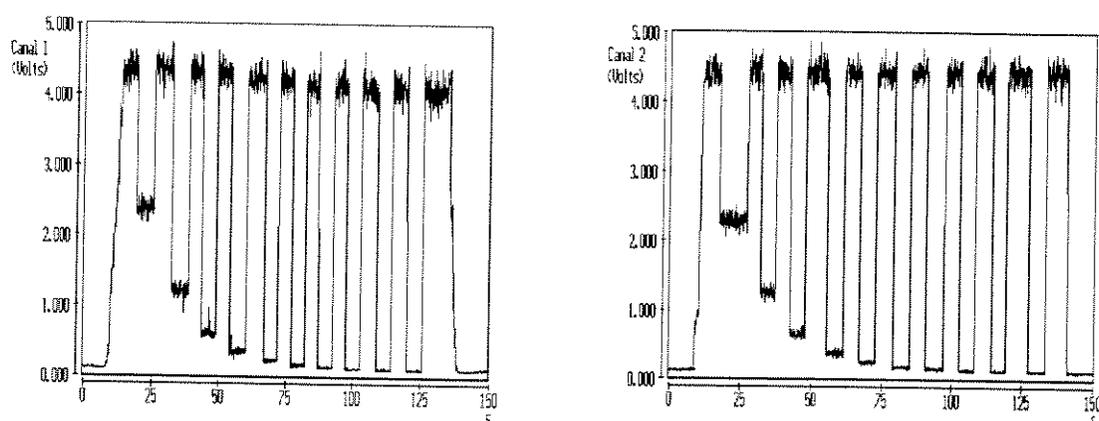


fig 4.5 - Intensidade de luz para diversas combinações dos filtros de densidade. a) - canal-1 e b) - canal-2. Nível superior do sinal: intensidade de luz sem filtro. Níveis inferiores: cada nível corresponde a uma combinação de filtros conforme coluna 1 da tabela 4.1.

Dividindo o sinal obtido com cada conjunto de filtros pelo sinal imediatamente anterior conseguimos os valores de transmitância apresentados na tabela 4.1.

Nas tabela 4.2 encontram-se os resultados da regressão linear de cada conjunto de dados. Na figura 4.6 podemos ver a correlação existente entre a intensidade de luz

incidente e o sinal de saída. As retas apresentadas (fig.4.6) são resultantes da regressão linear dos dados obtidos.

Tabela 4.1 - Dados de transmitância obtidos para os canais azul e verde

| Filtros | Canal-1 | | Canal-2 | |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | transm. nominal | transm. medida | transm. nominal | transm. medida |
| .5 | 0.480 | 0.528 | 0.490 | 0.500 |
| .5x.5 | 0.230 | 0.262 | 0.230 | 0.267 |
| .12 | 0.104 | 0.120 | 0.110 | 0.126 |
| .12x.5 | 0.050 | 0.068 | 0.054 | 0.060 |
| .03 | 0.026 | 0.029 | 0.026 | 0.032 |
| .03x.5 | 0.012 | 0.015 | 0.013 | 0.016 |
| .03x.5x.5 | 0.006 | 0.008 | 0.006 | 0.008 |
| .03x.12 | 0.003 | 0.003 | 0.0028 | 0.004 |
| .03x.12x.5 | 0.0013 | 0.0018 | 0.0014 | 0.0019 |
| .03x.12x.5x.5 | 0.0006 | 0.0008 | 0.0007 | 0.0009 |

Pode-se observar que a relação entre as intensidades relativas medidas e a transmitância dos filtros é linear (parâmetros da regressão mostrados na tabela) e que a inclinação da reta vale aproximadamente 1 como esperávamos

Tabela 4.2 - resultados da regressão linear.

| canal | Slop | r ² | P |
|-------|-------|----------------|----------|
| azul | 1.102 | 0.9993 | < 0.0001 |
| verde | 1.038 | 0.9966 | < 0.0001 |

Linearidade do sistema de detecção

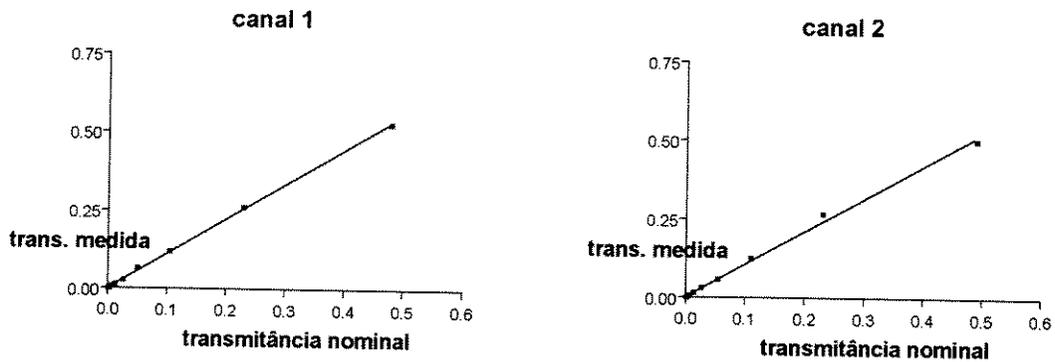


fig. 4.6 - Curvas mostrando a linearidade do sistema de detecção com relação à luz incidente.

O desvio obtido na inclinação pode ser devido a dois fatores: (a) erro na determinação da transmitância nominal para cada filtro. Para determinar esta transmitância escolhemos os valores $\lambda_1 = 400\text{nm}$ e $\lambda_2 = 500\text{nm}$ desprezando a banda passante de cada filtro. (b) erro na composição dos filtros. Devido a reflexões múltiplas, uma vez que associar dois filtros de transmitância 0.5 não é equivalente a um filtro de 0,25 .

4.3 - Alinhamento Óptico

O objetivo deste teste foi determinar se havia alinhamento dos eixos ópticos do sistema, ou seja, certificar de que o objeto visto no monitor de TV era realmente a fonte da luz que chega às PMT's. Para isto foi utilizada, como objeto, uma

microesfera de vidro, fluorescente, de 15 μm de diâmetro (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA) e aplicado o protocolo apresentado a seguir:

- a microesfera foi depositada em uma lamínula de vidro e esta foi colocada no estágio do sistema de fluorescência.

- Pela observação da microesfera no monitor de TV o foco foi ajustado e as fendas fechadas de modo que a imagem vista fosse somente da esfera. Neste ponto a esfera estava sendo iluminada somente pela luz vermelha do LED.

- iluminando a esfera com a luz ultra-violeta obtivemos então um sinal de fluorescência no canal-2. Infelizmente a esfera só emitia em torno 500 nm que corresponde ao canal-2 o que nos impossibilitou de verificar o alinhamento do eixo azul com este protocolo.

- modificando a posição da esfera vista no monitor registramos as intensidades de luz emitidas. O registro e um desenho esquemático das posições são apresentados na figura 4.7.

Como se pode observar, o máximo da emissão ocorre quando a esfera está centrada na janela, o que significa que o eixo óptico relacionado ao canal-2 (luz verde) está alinhado com o eixo óptico relacionado à monitoração (luz vermelha).

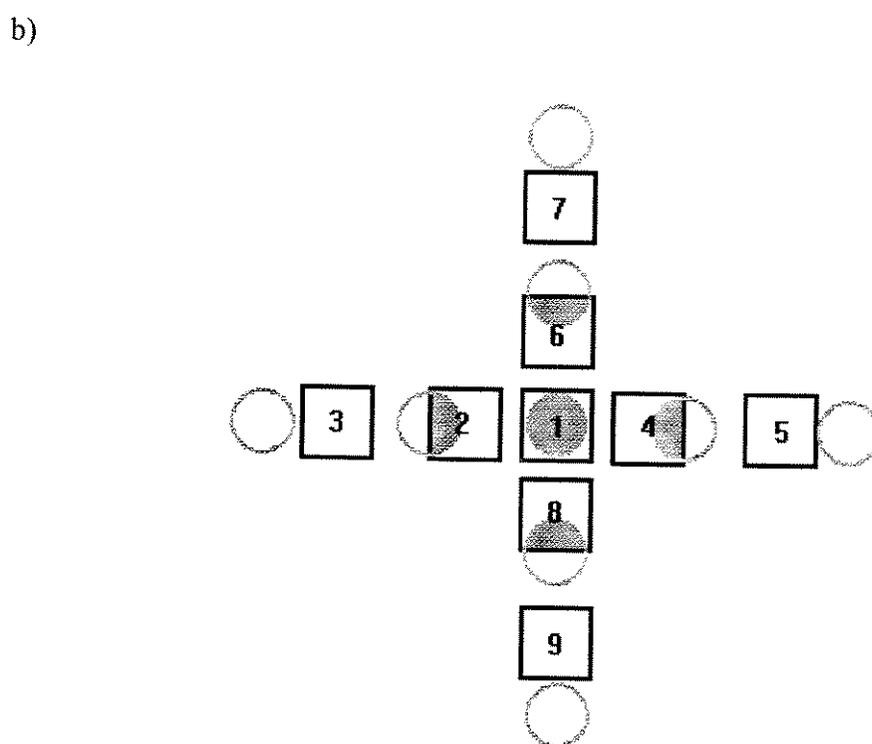
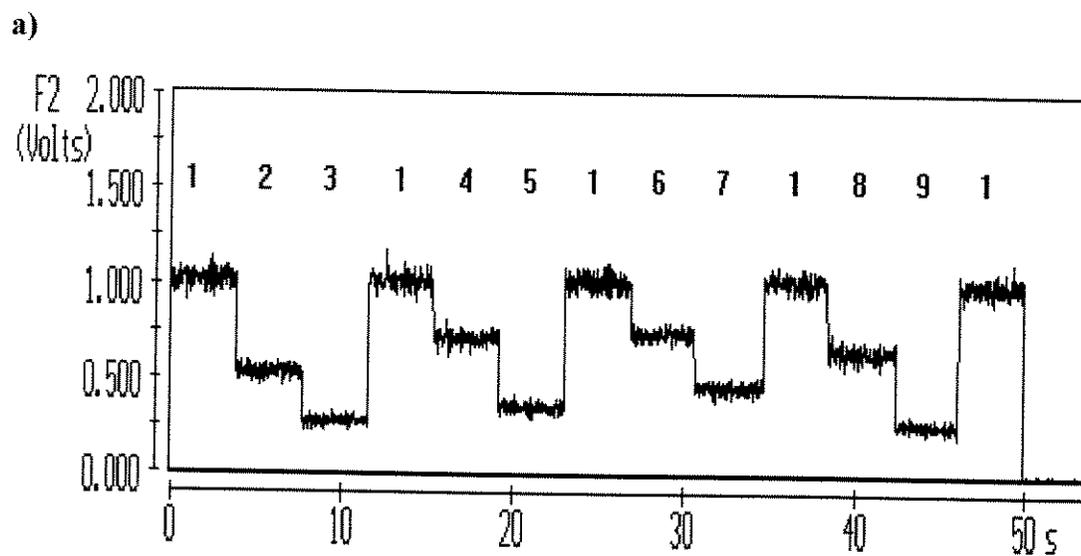


fig 4.7- teste do alinhamento do sistema: a) registro da intensidade de luz medida no canal 2 quando a posição da esfera fluorescente é modificada. b) esquema das posições da esfera.

Para teste do alinhamento do eixo azul foi necessário utilizar outra metodologia. Para este teste foi utilizada a água tônica como amostra. A água tônica emite luz verde e azul em uma proporção bem definida e é bastante estável com relação a fotodegradação. O protocolo utilizado foi o seguinte:

- a água tônica foi colocada em uma câmara de perfusão preenchendo todo seu volume.
- as fendas foram posicionadas de modo que a janela ocupasse todo o monitor de TV.
- A intensidade de luz ultra-violeta foi aumentada até que o sinal no canal azul se aproximasse de 5V.
- A fenda superior foi então fechada, registrando a razão entre as duas intensidades.
- em seguida foi feito o mesmo para a fenda inferior.

Pode-se observar na figura 4.8a que, ao fecharmos a fenda, a razão média se mantém constante, indicando que com relação a esta direção, o eixo azul está alinhado com o verde. Há diminuição da relação sinal/ruído pois a cada passo é reduzida a intensidade de luz em cada canal. Ao fecharmos a fenda na outra direção (figura 4.8b) uma flutuação da razão é observada. Provavelmente esta flutuação não é causada por desalinhamento, pois se assim fosse, a razão deveria ir monotonicamente a zero durante o fechamento. Esta flutuação deve ser provocada por algum tipo de reflexão espúria dentro das tubulações. Não nos preocupamos em resolver este problema pois ele ocorre para aberturas de fenda inferiores às utilizadas durante experimentos.

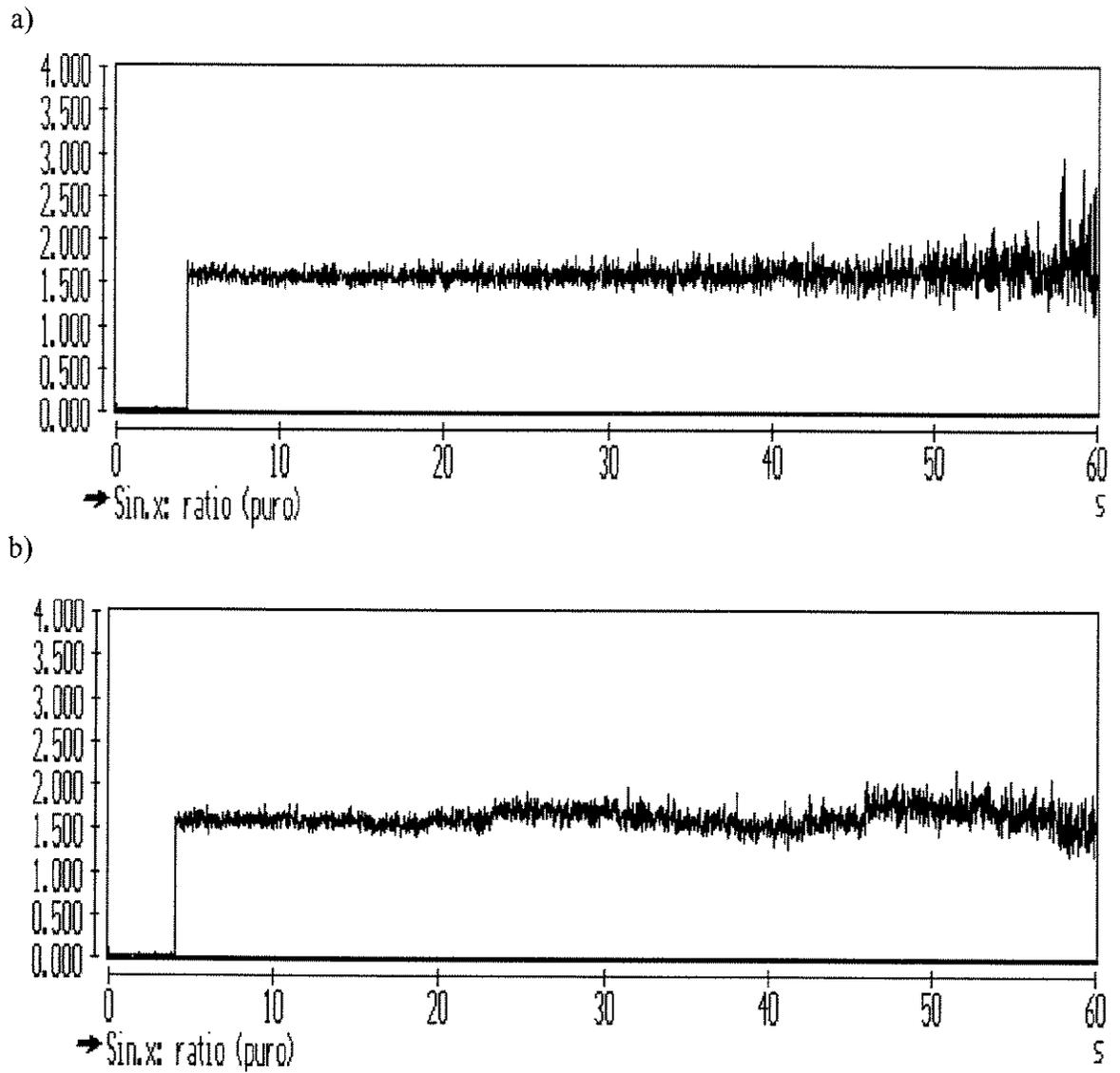


fig 4.8 - Razão *versus* abertura da fenda, na presença de água tônica como amostra. De 10 em 10 segundos a fenda era reduzida até que em ~50 segundos a abertura era de ~10 μ m. a) fenda superior; b) fenda inferior

Capítulo 5

Testes Biológicos

O objetivo deste capítulo é averiguar se o sistema de microscopia construído tem sensibilidade para detectar as variações da concentração de cálcio que ocorrem dentro da célula cardíaca durante uma contração. Vamos descrever o material utilizado nos testes, o sistema e o protocolo de isolamento de células e finalmente os testes que fizemos utilizando o sistema de microscopia.

5.1 - Material Utilizado nos Testes Biológicos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando de 300 a 400 gramas, provenientes do biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas recebendo água e ração “*ad libitum*” e não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

Soluções

Durante os testes com células foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit (KH) com a seguinte composição (mM): NaCl 126,4; KCl 4,6; KH₂PO 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 13,6; CaCl₂ 1,0 ; GLICOSE 11,11 ; pH 7,4 a 22 °C , saturado com 95% de O₂, 5% de CO₂.

Para isolamento de células foram utilizadas três soluções: a solução de Krebs-Henseleit modificada (KH-isol) em mM: NaCl 131,4; KCl 4,6; KH₂PO 1,2; NaHCO₃ 8,5; MgSO₄ 2,4; GLICOSE 11,11; pH 7,4 a 22 °C , saturado com 95% de O₂, 5% de CO₂. A solução de Tyrode (Ty) em mM: NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 1,5; CaCl₂ 1,0; Hepes 5 ; GLICOSE 11,11; pH 7,4 a 22 °C e a solução de Tyrode modificada (Ty-isol) em mM: NaCl 140; KCl 4,5; MgCl₂ 2,4; Hepes 5; GLICOSE 11,1; pH 7,2 a 22 °C, ajustado com NaOH.

Estimulador Elétrico

Para estimular eletricamente as células cardíacas foi utilizado um estimulador construído no CEB (projeto do Dr. C..M. de Godoy) com as seguintes características:

- tensão máxima: 15V;
- corrente máxima : 100mA;
- frequência regulável: 0,1 a 10 Hz;
- duração do pulso bipolar: 0,5 a 18ms.

5.2 - Isolação de Células Cardíacas

O Sistema de Isolação

Este sistema consiste basicamente de um aparato tipo Langendorff modificado para permitir a troca da solução de perfusão. O aparato é mostrado de maneira esquemática na figura 5.1.

Apoiado em uma base feita de granito com hastes de latão temos três frascos de vidro com camisa externa por onde passamos água a temperatura controlada. Esta água é bombeada em circuito fechado por um equipamento que contém também uma resistência de aquecimento controlada por um circuito eletrônico. Chamamos este equipamento simplesmente de “controlador de temperatura” (construído no Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp).

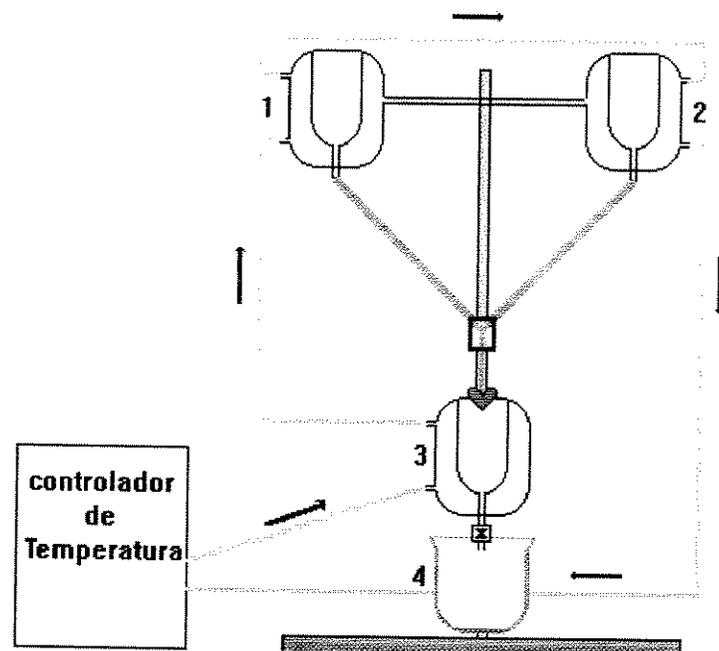


fig 5.1 - desenho esquemático do sistema de isolação de células: 1 e 2, frascos para as diferentes soluções; 3, frascos para recolhimento da solução após a perfusão coronariana; 4, bequer para recirculação.

A temperatura dos frascos e das soluções neles contidas pode ser variada e estabilizada em qualquer ponto entre temperatura ambiente e 50 °C. Durante o isolamento de células a temperatura do perfusato é mantida a 37 °C. A recirculação da solução é feita manualmente e o frasco 3 tem a função de manter constante a temperatura da solução que já perfundiu o coração, até que ela seja colocada de volta em um dos frascos superiores. Para esta operação utilizamos um bequer comum.

O Protocolo de Isolação de Células

- O animal é sacrificado por concussão cerebral 15 a 20 minutos após a injeção de heparina, substância anti-coagulante (2000-5000 UI, i.p.);
- o coração é dissecado e imerso em solução KH-isol;
- a aorta é canulada e o coração é perfundido retrogradamente com KH-isol por 3 a 5 min (preparação de Langendorff). Esta perfusão é feita para se remover o sangue das câmaras cardíacas e vasos coronarianos;
- a solução de perfusão é trocada para a KH-isol contendo colagenase (0.7 - 1mg/ml, Worthington,USA) e protease (0.04 - 0.08 mg/ml, Dispase, Boehringer-Mannheim,USA);
- após 3 a 10 minutos na presença das enzimas, o coração é novamente perfundido por KH-isol durante 2 minutos e então removido do aparato;
- os ventrículos são cortados em pequenos pedaços que são agitados levemente em temperatura ambiente em Ty-isol por 5 minutos. Em seguida o tecido é fragmentado em pedaços ainda menores e novamente agitado por mais 5 minutos;
- as suspensões de células são filtradas e deixadas sedimentar por 15 min;

- em 4 lavagens sucessivas, o sobrenadante é removido e substituído por Ty-isol contendo concentrações crescentes de CaCl_2 , até atingir 1mM.

5.3 - Carregando as células com o indicador.

Uma vez obtidas as células, o passo seguinte é carregá-las com o indicador fluorescente (Bassani et al., 1994). Por este procedimento ser bem discutido na literatura (Moore, et al., 1990) vamos descrevê-lo aqui bem resumidamente:

- células isoladas são colocadas em uma câmara de perfusão. O fundo desta câmara, formado por uma lamínula de vidro, é tratado com colágeno, para aumentar a adesão celular;
- o excesso de células e as células que não aderiram à lamínula são lavados com KH.
- 200 microlitros de solução contendo $10\mu\text{M}$ de indo-1 e pluronic (Molecular Probe, USA) são colocados na câmara;
- as células são incubadas por 20 min à temperatura ambiente (22°C);
- as células são então perfundidas com KH por 40 min para que haja a remoção do indicador que ficou fora das células. Após este período a fluorescência aumenta um fator ~ 4 com relação à autofluorescência da célula.

A tabela 5.1 contém o valor da fluorescência em cada canal para 8 células, antes do processo de carregamento (auto-fluorescência), durante a incubação (20 min após seu começo) e depois do período de deesterificação (após os 20 min de incubação e 40 min de lavagem).

Tabela 5.1 - Fluorescências antes, durante e depois do processo de carregamento.

Todos os valores são dados em milivolts.

| célula | auto-fluorescência | | 20 min de carregamento | | após deesterificação | |
|--------|--------------------|---------|------------------------|---------|----------------------|---------|
| | canal 1 | canal 2 | canal 1 | canal 2 | canal 1 | canal 2 |
| 1 | 41 | 28 | 111 | 82 | 125 | 71 |
| 2 | 53 | 28 | 219 | 143 | 156 | 87 |
| 3 | 47 | 25 | 315 | 242 | 131 | 86 |
| 4 | 83 | 49 | 502 | 359 | 529 | 321 |
| 5 | 50 | 35 | 400 | 241 | 289 | 171 |
| 6 | 110 | 42 | 295 | 213 | 157 | 97 |
| 7 | 29 | 15 | 163 | 136 | 220 | 123 |
| 8 | 50 | 28 | 198 | 133 | 130 | 73 |

A figura 5.2 ilustra um registro típico realizado durante o processo de carregamento.

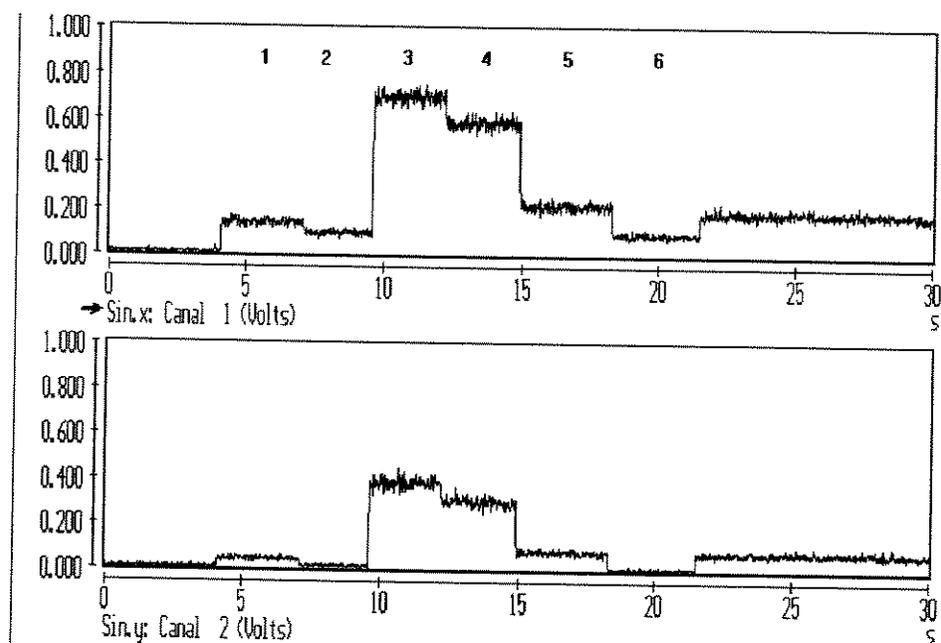


fig 5.2 - sinal registrado (V) em cada um dos canais durante o carregamento: 1- autofluorescência da célula; 2- sinal de fundo, sem a célula na janela; 3- fluorescência da célula com indo-1, 20 min após carregamento; 4 - sinal de fundo com solução contendo indo-1 AM ; 5 - fluorescência da célula carregada em repouso, após lavagem do indicador não deesterificado; 6- sinal de fundo, sem a célula na janela.

5.4 - Transientes de cálcio e o tratamento de dados escolhido

Uma vez que tínhamos em mãos células cardíacas isoladas e carregadas com o indicador indo-1, o passo seguinte seria estimular estas células e tentar medir as variações de R (razão de fluorescência) durante uma contração.

A figura 5.3 ilustra os registros (dados sem processamento) obtidos durante uma sequência de estímulos à frequência de $\sim 0,6$ Hz.

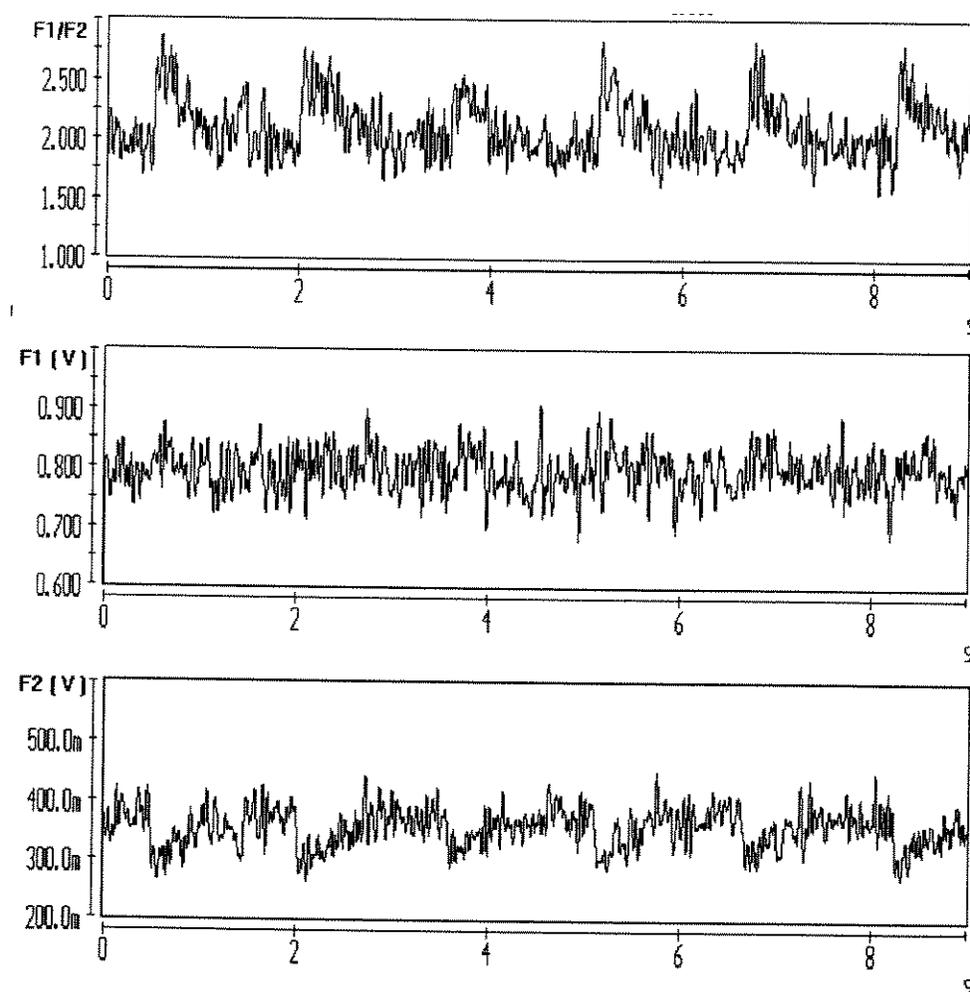


fig 5.3 - fluorescências medidas nos canais 1 e 2 (registros inferior e central) e razão entre elas (registro superior). Taxa de aquisição 1000Hz e filtragem eletrônica em 25Hz. Estimulação elétrica da célula em $\sim 0,6$ Hz.

Podemos observar que, apesar do sinal estar completamente mascarado pelo ruído no canal 1 e pouco nítido no 2, o transiente se mostra mais evidente na razão entre estes dois sinais.

Para melhorar a qualidade do sinal, o primeiro passo foi reduzir *a posteriori* a taxa de amostragem de 1000 para 50Hz, substituindo cada 20 pontos pela sua média (fig 5.4). Este procedimento diminui o ruído dos sinais sem atenuar significativamente as componentes do sinal abaixo de 25Hz, que mais nos interessam. A redução da taxa pela média é feita pelo próprio programa de aquisição.

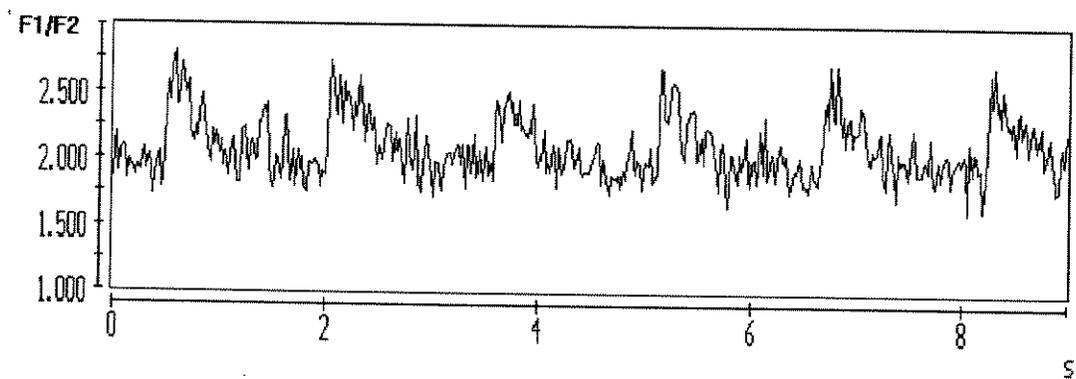


fig 5.4 - razão entre sinal F1 e F2 com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz substituindo cada 20 pontos pela média.

Após a redução optamos por fazer o alisamento dos dados (*smoothing*) em um outro programa. Os resultados obtidos após este tratamento estão apresentados nas figuras 5.5 e 5.6.

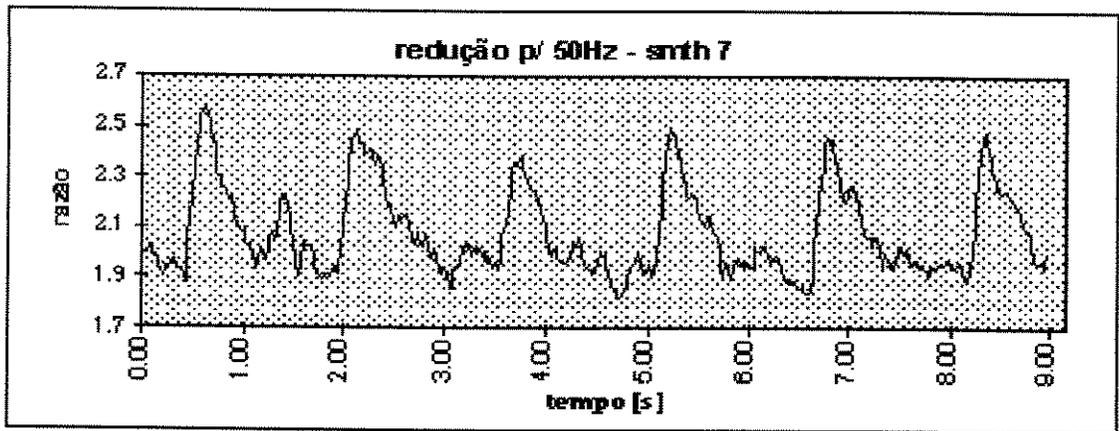


fig 5.5 - razão com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz e alisamento com 6 vizinhos (smth7).

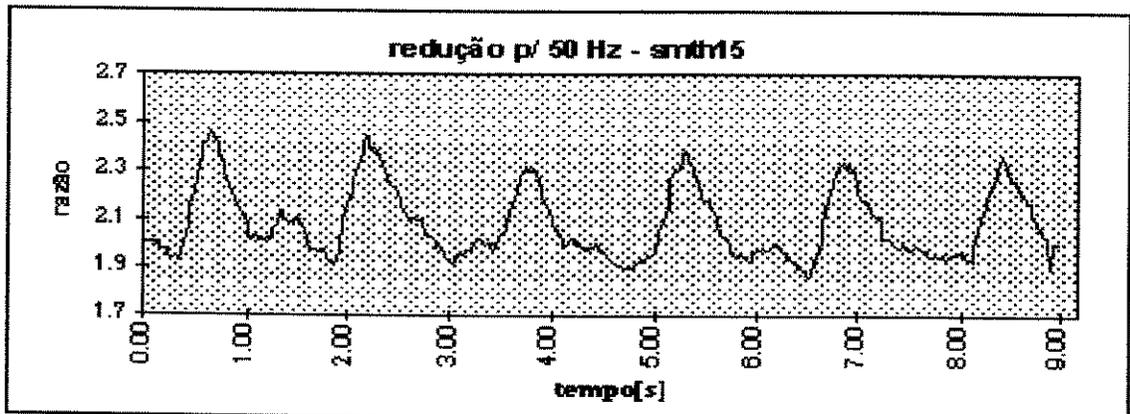


fig 5.6 - razão com taxa de amostragem reduzida de 1000 para 50Hz e alisamento com 14 vizinhos (smth15).

Optamos por tratar todos os dados como na figura 5.5 pois, a nosso ver, este tratamento possibilita a determinação do valor de pico do transiente com precisão maior do que o obtido com o tratamento da figura 5.4 e não deforma tanto o transiente quanto o tratamento mostrado na figura 5.6 .

5.4 - Potenciação Pós-Pausa

O primeiro transiente após uma pausa da estimulação tem amplitude diferente do transiente em regime (SS) em várias espécies animais. Em ratos, tanto a resposta contrátil como o transiente de cálcio pós-pausa tem suas intensidades aumentadas, a chamada potenciação pós-pausa. A figura 5.7, obtida em nosso sistema, ilustra este fenômeno como tipicamente observado em miócitos ventriculares de ratos (Bassani & Bers, 1994).

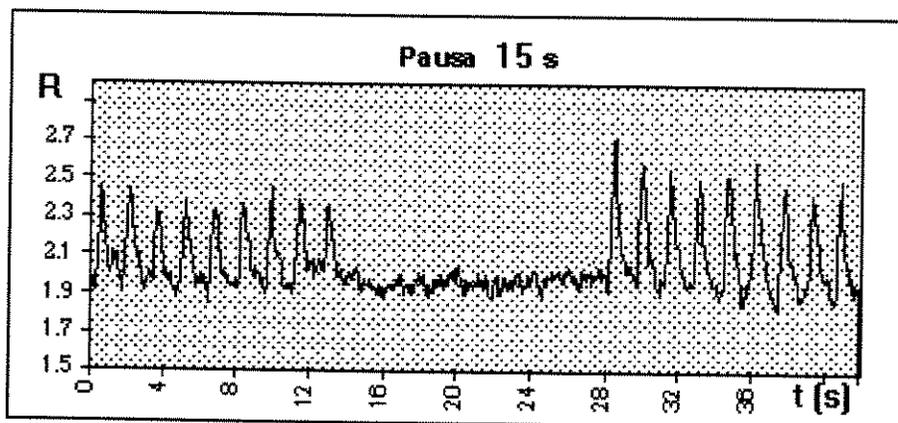


fig 5.7 - transientes (da razão de fluorescências) pós-pausa estimulatória de 15s.

O resultado observado serve como ilustrativo da capacidade do sistema desenvolvido de detectar pequenas variações da razão de fluorescências. Além disso, a resposta dentro do resultado esperado é indicativa da boa condição das amostras utilizadas.

5.5 - O transiente em resposta à cafeína

A aplicação rápida de cafeína causa um transiente de Ca^{2+} de amplitude e duração maiores que os obtidos por estimulação elétrica, acompanhado de uma contratura da célula causada pela liberação de todo o conteúdo de Ca^{2+} do RS, induzida pela cafeína (Bers, 1991).

A figura 5.8 ilustra um transiente de R devido à aplicação rápida de cafeína (10mM). A indução de transientes de Ca^{2+} por aplicação de cafeína constitui-se em técnica amplamente utilizada para avaliação do conteúdo de Ca^{2+} do RS (Bassani et al., 1992; Varro et al., 1993).

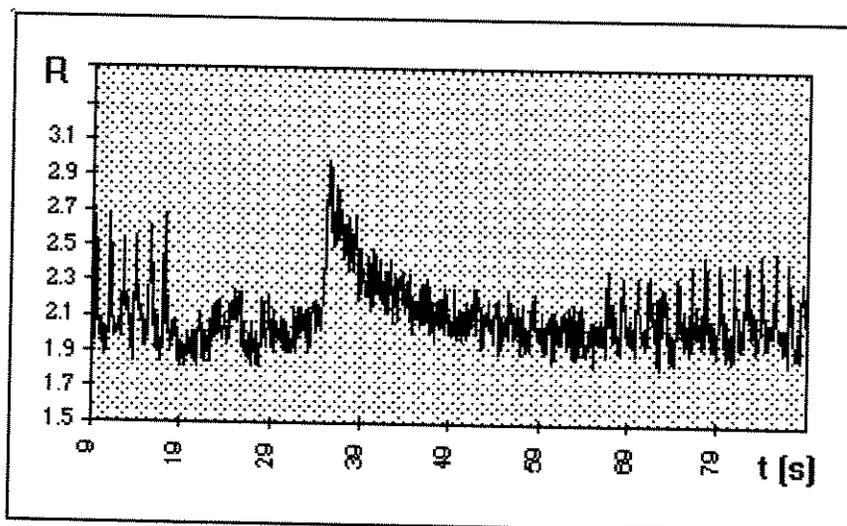


fig 5.8 - transiente de cálcio (razão) em miócito isolado de rato, induzido por aplicação rápida de cafeína.

A célula, neste caso, exibe uma potente contratura (observada no monitor de TV) retornando posteriormente ao seu comprimento inicial. A amplitude da razão de fluorescência e da contração (esta última não registrada neste trabalho) são maiores que aquelas observadas durante estimulação elétrica regular.

Resultados e Discussão

Bases Teóricas

Apresentamos os aspectos básicos do fenômeno da fluorescência e obtivemos as expressões para as quantidades de luz absorvida (Eq. 2.3) e emitida (Eq. 2.4) por uma amostra de baixa absorção. Vamos agora focalizar nossa atenção ao estudo de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos isolados, usando o indicador indo-1. Considerando que δ , a espessura da célula, é tipicamente $\sim 10 \mu\text{m}$ (Hiroshi et al., 1996), $c \sim 50 \mu\text{M}$ (Berlin et al., 1994) e $\epsilon \sim 34 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Grynkiewicz, et al., 1985), a fração da luz de excitação que é realmente absorvida é $I_{ab}/I_i \sim 1,7 \times 10^{-3}$. Os valores de Q para o indo-1 são 0,38 e 0,50 nas condições livre e ligado, respectivamente (Grynkiewicz, et al., 1985). Se a banda passante é $\pm 10 \text{ nm}$, então $P(\lambda)d\lambda$ no pico do espectro será cerca de 15% de Q . Assim a razão luz emitida para luz incidente será $I/I_i \sim 10^{-4}$. Este já é um resultado útil, tanto para o projeto de instrumentação, quanto para propósitos experimentais, especialmente se lembrarmos que há necessidade de se efetuar as medições em uma condição na qual a relação sinal-ruído seja aceitável. É fácil imaginar que, para um nível de sinal da ordem do apresentado acima, qualquer

luz espúria, no ambiente ou não filtrada adequadamente, poderá ser um grande problema e inviabilizar as medições.

Da equação 2.11, é possível calcular $[Ca^{2+}]$, desde que os parâmetros de calibração e \mathcal{R} sejam conhecidos. A partir das equações 2.5, 2.7 e 2.8, podemos obter:

$$\mathcal{R} = [c_f \varepsilon_f P_f(\lambda_1) d\lambda_1 + c_b \varepsilon_b P_b(\lambda_1) d\lambda_1] / [c_f \varepsilon_f P_f(\lambda_2) d\lambda_2 + c_b \varepsilon_b P_b(\lambda_2) d\lambda_2]$$

Este resultado nos permite concluir que \mathcal{R} e, conseqüentemente $[Ca^{2+}]$, são independentes da área e da espessura da amostra. Esta informação é muito importante quando trabalhamos com amostras que podem, por exemplo, contrair-se, produzindo quantidade suficientemente grande de artefato de movimento, como é o caso das células musculares cardíacas. Da equação acima, pode-se verificar também que \mathcal{R} é independente da luz de excitação.

Ao analisarmos o significado microscópico de \mathcal{R}_{min} e \mathcal{R}_{max} , vemos que estes parâmetros são altamente dependentes dos espectros de emissão das moléculas do indo-1 nos estados livre e ligado, bem como dos comprimentos de onda de emissão e da largura das bandas passantes do sistema de detecção. Como o espectro do indo-1 depende da composição do meio no qual ele se encontra (Hove-Madsen & Bers, 1992) deve-se ter a cautela, ao trabalhar com amostras biológicas, de determinar estes parâmetros na amostra e preferencialmente em cada experimento. Os parâmetros de calibração \mathcal{R}_{min} e \mathcal{R}_{max} dependem ainda das características ópticas de cada canal de medição. A consequência destas observações é que, qualquer modificação dos componentes ópticos, como, por exemplo, substituição de filtros de interferência,

alinhamentos ópticos, ou mesmo mudanças no diâmetro da íris em microscópios confocais, torna necessária uma nova calibração.

É importante notar que β , parâmetro frequentemente considerado como dependente do equipamento de medição (*setup dependent*), na realidade é altamente dependente das características de absorção e emissão do indicador. O valor deste parâmetro de calibração determinado para um dado tipo celular, por exemplo, não será necessariamente o mesmo para outros tipos de célula. Ao contrário de R_{\min} e R_{\max} , β depende fortemente do comprimento de onda da luz de excitação, sendo que uma mudança de 355nm para 365nm pode mudar este parâmetro por um fator 2.

O parâmetro K_d é um fator multiplicativo (Eq. 2.11), o que implica que modificações neste parâmetro afetam de modo linear a $[Ca^{2+}]$ estimada. A condição ideal seria determinar K_d em cada condição experimental particular. Infelizmente, devido a dificuldades técnicas, observa-se frequentemente na literatura o uso de valores de K_d determinados *in vitro* para a calibração de sinais obtidos em experimentos com células intactas. Vários fatores podem afetar K_d . Por exemplo, K_d é afetado significativamente pela temperatura. A 23 °C, o K_d do indo-1 obtido *in vitro* chega a 440 nM (Bassani & Bers, 1995), o que é quase o dobro do valor mais comumente usado, de 250 nM a 37 °C (Grynkiewicz et al., 1985). Talvez o fator que mais dramaticamente afete K_d seja a presença de proteína, cuja concentração é alta no ambiente intracelular. Há relatos de que proteína, além de mudar o espectro de emissão, também aumenta o K_d do indo-1 e do fura-2 (Konishi et al., 1988; Hove-Madsen & Bers, 1992, mas veja também Westerblad & Allen, 1996). Um valor de K_d de 0.84 μ M para indo-1 foi recentemente estimado em miócitos cardíacos isolados

intactos (Bassani et al., 1995). Estas observações apontam para os riscos do uso de valores de K_d obtidos *in vitro* para experimentos *in vivo*. Embora a determinação de K_d *in vivo* não seja teoricamente necessária para cada experimento, mas apenas para cada tipo celular estudado, o procedimento é complicado e demorado. Ainda há a necessidade do desenvolvimento de métodos mais simples para a determinação do K_d *in vivo*.

Um modo de simplificar a calibração seria o uso de λ_2 no ponto isobéptico. Uma vez que este comprimento de onda de emissão é independente da $[Ca^{2+}]$, β seria igual a 1 e, portanto, $K_d\beta = K_d$ (veja equação 2.11). Porém, deve-se ter cuidado com as condições experimentais, uma vez que Hove-Madsen & Bers (1992) mostraram que o ponto isobéptico do indo-1 encontra-se desviado em miócitos permeabilizados, com relação ao obtido em solução aquosa (compare as figs. 3A e 3C do trabalho supra-citado).

Ao analisarmos o efeito de se medir as razões com um equipamento não ideal, podemos verificar que $[Ca^{2+}]$ estimado não se altera mesmo quando as eficiências ópticas de cada canal são diferentes (fig 2.6). Este resultado deve ser analisado com cuidado, pois ele só é válido se as constantes de calibração e os valores de R forem obtidos com as mesmas eficiências. Caso Y em um dos canais seja alterado depois da determinação dos parâmetros, por exemplo alterando-se a tensão da PMT, estes parâmetros não são mais válidos.

No anexo do capítulo 2 mostramos que a trajetória dos pontos $F = (F_2, F_1)$ para uma dada amostra é descrita por uma reta, se a quantidade de indicador, a luz de excitação e a área da amostra se mantêm constantes. A inclinação desta reta é determinada apenas por constantes relacionadas à absorção e emissão de luz pelo

indicador. Assim, este resultado pode ser usado de maneira interessante na determinação do efeito de um dado composto químico sobre o indicador. Uma mudança na inclinação da reta após a aplicação do composto indica claramente que β foi alterado (equação 2.21), invalidando a calibração feita anteriormente.

Analisando as figuras 2.7a e b, podemos concluir que a subtração incorreta de um *background* pode gerar duas consequências bastante diversas. Em um dos casos, $\alpha_0 < \alpha_{bg} < \alpha_{sat}$, temos a diminuição da faixa dinâmica de R, no outro, $\alpha_0 > \alpha_{bg}$ ou $\alpha_{bg} > \alpha_{sat}$, temos uma situação onde a conversão de R para $[Ca^{2+}]$ pode se tornar impossível.

Obtivemos a equação 2.21 que nos permite chegar ao valor de β utilizando somente razões de fluorescências, ou seja, sem a necessidade de medirmos fluorescências absolutas, como é feito nos métodos tradicionais. Como trabalhamos com células que se contraem, esta possibilidade tem grande importância pois, na maior parte dos casos, há perda do indicador entre a situação de baixo e alto cálcio, o que interfere nos resultados. Obtivemos também um limite teórico para o valor de β , o que pode auxiliar na análise dos dados obtidos.

Ao determinarmos um experimento a ser feito, é fundamental determinarmos se o equipamento utilizado tem sensibilidade na faixa de variação de $[Ca^{2+}]$ que pretendemos medir. Determinamos a função S (equação 2.25) com o objetivo de ajudar nesta análise. Verificamos que o máximo de sensibilidade (equação 2.26) está sempre em um valor de Ca^{2+} abaixo de uma unidade de $K_d \beta$ (tipicamente $0.5 * K_d \beta$), e não em $K_d \beta$, como poderíamos supor a partir da curva sigmóide que descreve a relação entre R e pCa. Vemos também (equação 2.27) que o valor de S é sempre

menor que 1. A consequência imediata deste fato é que o curso temporal do transiente de Ca é sempre mais rápido do que do transiente de R.

Ao analisarmos o erro sistemático introduzido na estimativa de $[Ca^{2+}]$ causado por um erro na determinação de R_{min} , mostramos que este erro não é simétrico (equação 2.28), ou seja, um erro de 10% em R_{min} introduz na estimativa de $[Ca^{2+}]$ um erro maior que um erro de -10%. Assim, argumentamos que a utilização da média de R_{min} de uma população como parâmetro de calibração não minimiza o erro global do experimento. Propusemos então que fosse utilizado como R_{min} o extremo inferior do intervalo de confiança para 95%, de modo que a grande maioria das células estudadas tivessem seu R_{min} maior do que o parâmetro utilizado. É difícil avaliar o quanto este procedimento contribui para a diminuição do erro global, entretanto pode-se garantir que, pelo menos ao se trabalhar em uma faixa de baixo cálcio, o número de experimentos perdidos devido a impossibilidade de conversão de R para $[Ca^{2+}]$ deve diminuir de um fator 10 (de 50% para 5%).

O sistema de fluorescência

Conseguimos satisfazer todos os requisitos estabelecidos construindo o sistema descrito no capítulo 3, que conta ainda com as seguintes inovações:

- o sistema, ao contrário dos sistemas comerciais, não é montado em torno de um microscópio invertido. Isto, além de minimizar os custos, possibilita o trabalho em um ambiente com maior espaço e diminui a necessidade de manutenção;
- o iluminador tem como fonte uma lâmpada halogênica, de baixo custo e alimentação simples. Esta lâmpada pode ser ligada e desligada durante o experimento, em períodos em que não está se medindo fluorescência, diminuindo o aquecimento, consumo de

energia e produção de ozônio. Esta lâmpada não emite tanta luz UV como as lâmpadas de arco, mas como o indicador indo-1 pode ser foto-degradado por excesso de luz, o uso de altas intensidades pode prejudicar os experimentos. A intensidade de luz emitida pela lâmpada halogênica se mostrou suficiente.

- trabalhamos com uma objetiva de fluorescência seca, que, além de menos onerosa, exige menor cuidado no dia a dia. Esta objetiva coleta a luz em um ângulo inferior ao da objetiva de imersão, mas a eficiência óptica global do sistema se mostrou satisfatória.

- a óptica é ajustável, de modo que podemos aumentar a magnificação da imagem aumentando a quantidade de luz coletada (modificando a w.d.). Esta característica é interessante quando se trabalha com amostras pequenas, com sinal baixo.

Apesar do custo do sistema ser muitas vezes inferior ao de sistemas comerciais, há ainda a possibilidade dele ser diminuído com modificações simples, como a substituição de fontes variáveis de tensão por fontes fixas. Há também modificações que melhorariam o sistema como um todo, como o uso de lâmpadas frias de UV, que baixam o consumo de energia e diminuem o calor dissipado. Uma modificação mecânica simples que afeta diretamente a acurácia das medições é a substituição das fendas que se fecham sempre em um sentido por fendas que pudessem ser giradas. Este tipo de dispositivo possibilitaria que trabalhassemos sempre com a célula ocupando toda a janela, o que diminuiria o ruído de fundo nas medidas.

Testes de bancada

O teste do iluminador mostra que este gera pouco ruído em alta frequência (fig. 4.2) e tem intensidade de luz constante após um período de estabilização térmica. Utilizando uma amostra fluorescente, pudemos constatar que a razão medida é realmente independente da intensidade de luz de excitação (fig. 4.3). No entanto, observamos uma diminuição severa da razão sinal-ruído quando a luz de excitação é muito pequena.

Um requisito fundamental para que os valores de R possam ser corretamente convertidos para $[Ca^{2+}]$ é que haja relação linear entre a luz que incide sobre as PMTs e o sinal registrado. O teste de linearidade mostrou que, em uma faixa dinâmica de 10^3 , esta relação se mantinha, sendo que para o canal 1 o valor de r^2 foi 0.9993 e para o canal 2, 0.9966. Os valores da inclinação da reta foram 1.102 para o canal azul e 1.038 para o verde. Este desvio de 10 e 4% do valor esperado pode ser explicado por dois fatores: primeiro, é difícil determinar-se o valor real do comprimento de onda máximo da banda passante de cada canal, pois esta faixa é dada por uma composição dos espectros de transmitância de cada um dos componentes ópticos do sistema; segundo, a composição de dois filtros de densidade não é equivalente a um filtro com transmitância igual ao produto das transmitâncias dos dois filtros. Isto porque, quando sobrepomos dois ou mais filtros, aumentamos o número de interfaces, causando reflexões múltiplas que diminuem a transmitância total.

O teste de alinhamento tinha como objetivo determinar se havia um alinhamento dos eixos ópticos do sistema. Ou seja, queríamos nos certificar de que o objeto visto no monitor de TV é realmente a fonte da luz que chega às PMTs. Este

teste foi feito em duas etapas, pois a microesfera fluorescente que usamos como fonte não emitia em comprimentos de onda próximos ao detectável pela PMT do canal azul. Na primeira etapa, certificamo-nos de que a fonte de luz verde que chegava à PMT do canal dois era realmente o objeto visto no monitor (fig 4.7). Na segunda etapa, mostramos que a razão entre as fluorescências dos dois canais se mantinha constante quando as fendas permaneciam fechadas (fig 2.8) , indicando o alinhamento do eixo relativo ao canal 1.

Testes biológicos

Células cardíacas de ratos adultos foram isoladas e carregadas com o indicador indo-1 AM (fig. 5.2). Ao estimularmos as células carregadas, obtivemos os transientes esperados (fig 5.5), enquanto podíamos ver a contração das células no monitor. Quando a célula monitorada não apresentava contração, mesmo sendo estimulada, não observávamos modificação do sinal, indicando que este não se tratava de artefato devido à estimulação.

Foi possível induzir, nos miócitos carregados com indo-1, alguns comportamentos que levam a respostas previsíveis e que podem ser avaliados do ponto de vista qualitativo.

O fenômeno da potenciação pós-pausa, bem descrito na literatura (Bassani & Bers, 1994c), é uma característica que está presente nos miócitos cardíacos de ratos. A obtenção deste resultado (fig 5.7) é uma indicação de que tanto as células, quanto o sistema estavam se comportando da maneira esperada.

Outra indicação de que estávamos com amostras de qualidade adequada e com um sistema pronto para o trabalho foi a obtenção do transiente em resposta a

um pulso rápido de cafeína (fig 5.8). Este transiente, acompanhado de uma forte contratura da célula seguida de relaxamento (observada no monitor de TV), é devido à liberação de todo o conteúdo de Ca^{2+} do RS (Bers, 1991). Podemos observar na figura 5.8 que os primeiros transientes induzidos por estímulo elétrico, após a aplicação da cafeína, têm amplitude menor que os transientes anteriores durante a estimulação, indicando que o RS foi realmente depletado de Ca^{2+} pela cafeína. Após alguns estímulos, o amplitude do transiente aumenta, mostrando que o RS começa a ter seu conteúdo reestabelecido.

Encerramos a primeira parte deste trabalho, “**Desenvolvimento da Instrumentação**”, convencidos de que tínhamos em mãos um sistema de microscopia que correspondia às nossas necessidades e que as células cardíacas isoladas de ratos adultos se comportavam de maneira satisfatória. Passamos então à segunda parte deste trabalho, **Estudo de Células Cardíacas Isoladas**, que é apresentada a seguir.

Segunda Parte:

Estudo de Células Cardíacas Isoladas

Capítulo 6 - “Estimulação por campo de miócitos cardíacos: Experimentação *versus* Modelo Teórico”

Capítulo 7 - “Transiente de Ca^{2+} em miócitos cardíacos isolados de ratos durante o desenvolvimento pós natal: Parâmetros de Calibração e Características dos Transientes.”

O Projeto Temático FAPESP (95/0355-3) que vem sendo desenvolvido no LPCv tem como objetivo a compreensão da dinâmica do Ca^{2+} intracelular durante o desenvolvimento pós-natal de ratos. Em trabalhos preliminares com células de animais neonatos havíamos levantado dois problemas que deveriam ser esclarecidos antes que fosse atacado o problema central, o estudo do transporte e regulação de Ca^{2+} . O primeiro destes problemas era um desvio muito grande dos valores medidos de R de repouso, R_{rest} , em células de animais jovens com relação aos dos adultos. Como não tínhamos motivos para acreditar que $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em repouso deveria variar muito com o desenvolvimento, levantamos a hipótese de que os parâmetros de calibração não se mantinham constantes em diferentes idades.

O segundo problema era a enorme dificuldade de se estimular células de animais neonatos. Para que a célula seja estudada na situação mais fisiológica possível, deve-se evitar o uso de eletrodos invasivos para a estimulação, sendo mais apropriada a estimulação por campo. Embora possa parecer trivial estimular uma célula cardíaca com eletrodos externos, como é o caso com animais adultos, não obtivemos sucesso com as células de animais mais jovens. Utilizando tanto estimuladores construídos por nós como estimuladores comerciais, obtivemos, após muito esforço, pouco sucesso: éramos capazes de estimular menos que 1% das células aparentemente viáveis. Várias perguntas então foram colocadas: - qual o verdadeiro mecanismo da estimulação por campo? - por que as células de neonatos não são facilmente estimuláveis? - precisamos de campos mais intensos? - em caso positivo, como o animal recém-nascido produz os campos necessários para disparar o potencial de ação?

Para tentarmos responder a algumas destas perguntas, bem como para determinar a faixa de variação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante um transiente em diversas idades,

realizamos os experimentos que serão descritos a seguir. Apesar destes experimentos terem sido realizados simultaneamente, nós os dividimos em dois trabalhos independentes, de modo a facilitar a exposição dos métodos e resultados. Apresentaremos primeiro o trabalho relacionado à estimulação por campo, pois o domínio desta técnica foi fundamental para que o estudo sobre o transiente de cálcio em diversas idades fosse feito.

Capítulo 6

“ Estimulação por campo de miócitos cardíacos durante o desenvolvimento pós-natal: Experimentação vs Modelo Teórico”

6.1 - Introdução

A estimulação por campo (EC) é uma técnica amplamente utilizada no estudo de células excitáveis, principalmente por tratar-se de um procedimento não invasivo. No caso das células cardíacas, a EC é utilizada para disparar o potencial de ação (PA), primeiro evento do acoplamento excitação-contração. Pode-se então induzir uma contração celular sem a necessidade de lesar a membrana da célula, ou seja, da maneira mais fisiológica possível.

Além de ser usada como ferramenta para estudos da fisiologia da célula cardíaca, a EC pode trazer uma série de informações sobre questões de importância prática, como a otimização de marcapassos e desfibriladores para uso médico. Um dos objetivos daqueles que projetam e constroem desfibriladores é, por exemplo, reduzir a quantidade de energia depositada no tecido durante a desfibrilação, minimizando o dano causado pela aplicação de campos muito elevados. Um dos

caminhos para se avançar no entendimento da resposta do coração a estímulos elétricos é estudar a resposta de células isoladas a estes estímulos.

Há na literatura (Klee & Plonsey, 1976; Ranjan & Thakor, 1995) indicações de que o limiar de estimulação dependa fortemente da geometria da célula, bem como da orientação relativa entre o campo e a célula. Como a célula cardíaca muda tanto em tamanho quanto em forma durante o desenvolvimento, não haveria motivos para que o limiar se mantivesse constante.

Este capítulo tem como objetivo estudar a estimulação por campo em miócitos cardíacos durante o desenvolvimento pós-natal. Para tanto, descrevemos o modelo eletromagnético mais aceito para a EC (Tung *et al.*, 1991) e apresentamos suas equações. Construimos um aparato experimental (câmara de perfusão e estimulador) que permite a produção dos campos necessários para se estimular células de animais de qualquer idade. Medimos o limiar de estimulação para 112 células em cinco grupos de idades diferentes (5, 14, 21, 30 dias e adultos). Para cada uma das células, medimos também o comprimento dos eixos maior e menor, e o ângulo entre o eixo maior e a direção do campo.

Finalmente, comparamos os dados experimentais com resultados obtidos com o modelo teórico.

6.2. Bases Teóricas

O Modelo da Estimulação por Campo: A casca esférica

Ao passarmos uma corrente elétrica em um volume condutor de condutividade σ , nele é gerado um campo elétrico $\mathbf{E} = \mathbf{j} / \sigma$ onde \mathbf{j} é a densidade da corrente.

Se este volume condutor é uma solução fisiológica e nele se encontra uma célula, o campo \mathbf{E} produz um potencial ao longo de sua superfície externa que varia em função da posição. Como o interior da célula é preenchido por uma solução condutora, o citosol, o potencial interno da célula se mantém constante, ou seja, o volume interno é considerado equipotencial. Assim, o potencial através da membrana (V_m) varia com o potencial externo.

Um modelo simples para cálculo de V_m é o da casca dielétrica esférica de raio a e espessura δ , preenchida por um condutor de condutividade σ_i , colocado em um meio condutor infinito de condutividade σ_e (fig 6.1). No meio externo é impressa uma corrente que geraria, na ausência da casca dielétrica, um campo $\mathbf{E} = E_0 \mathbf{z}$ uniforme.

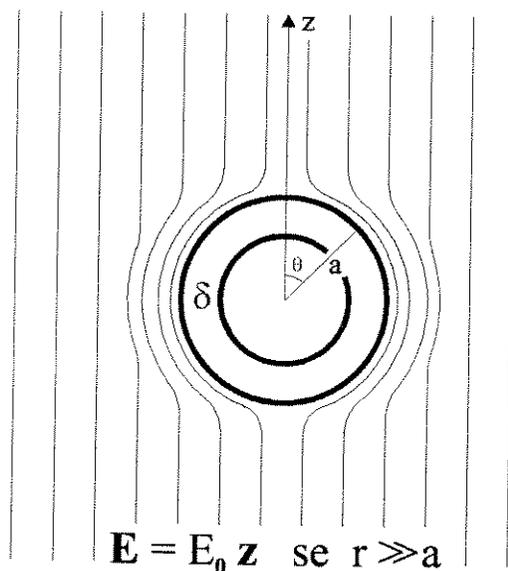


fig. 6.1 - Casca esférica dielétrica de raio a em meio condutor infinito com $\mathbf{E} = E_0 \mathbf{z}$ para $2r \gg a$. São mostradas as linhas de campo \mathbf{E} .

No volume externo, a função potencial elétrico (Φ_e) é uma solução da equação de Laplace que satisfaz as duas condições de contorno, com $r = a$ e $r = \infty$.

$$\nabla^2 \Phi_e = 0 \quad \text{equação de Laplace} \quad (6.1)$$

$$\delta \Phi_e / \delta r = 0 \quad \text{em } r = a \quad \text{condição de contorno sobre a casca esférica} \quad (6.2)$$

$$\delta \Phi_e / \delta z = -E_o \quad r \rightarrow \infty \quad \text{condição de contorno longe da casca} \quad (6.3)$$

A solução deste problema é obtida facilmente utilizando-se os Polinômios de Legendre (Lorrain & Corson, 1988).

$$\Phi_e(r, \theta) = -E_o \left[r + \frac{a^3}{2r^2} \right] \cos\theta \quad (6.4)$$

Como já foi dito, o potencial dentro da casca é constante. Definindo esta constante como zero temos então o potencial através da membrana V_m dado por:

$$\begin{aligned} V_m(\theta) &= \Phi_i(a-\delta, \theta) - \Phi_e(a, \theta) \\ &= 3/2 E_o a \cos\theta \end{aligned} \quad (6.5)$$

V_m varia então com o ângulo θ , sendo positivo de um lado da célula e negativo de outro.

Em repouso, as células cardíacas já se encontram com um potencial de membrana uniforme $V_{rest} \cong -85\text{mV}$. O efeito do estímulo externo em uma célula cardíaca é então hiperpolarizar um dos hemisférios e despolarizar o outro. Em todo o restante deste trabalho utilizaremos V_m como a variação do potencial transmembrana a partir de V_{rest} . Assim, V_m positivo significa despolarização da membrana e V_m negativo, hiperpolarização.

O modelo que adotamos assume que, quando V_m ultrapassa um certo valor V_L , potencial limiar, os canais de Na^+ se abrem gerando uma corrente de entrada que despolariza o restante da célula (Tung et al., 1991). A abertura destes canais é então o início do PA que leva, em última instância, à contração da célula como um todo.

Este modelo traz duas simplificações evidentes, mas que podem ser justificadas: Primeiro: a membrana celular não é um dielétrico perfeito, tendo uma certa condutividade σ_m relacionada com os canais de potássio retificadores (*inwardly rectifying potassium channels*). Utilizando-se um método não analítico (diferenças finitas), já foi demonstrado que essa condutividade da membrana biológica não altera significativamente o resultado obtido usando-se a casca dielétrica perfeita (Klee and Plonsey, 1976).

Segundo: utilizamos a aproximação quasi-estática, não levando em conta as constantes de tempo associadas à capacitância da membrana e à relaxação das soluções condutoras. Assumindo uma célula com parâmetros elétricos típicos (capacitância específica $\cong 1 \mu F/cm^2$; resistividades $\cong 500 \Omega cm$ e raio $\cong 10 \mu m$), obtém-se que a constante de tempo relacionada à polarização da célula é da ordem de microsegundos (Jeltsch, 1979). Como os estímulos utilizados são normalmente de 2ms e o P.A. dura de 50 a 300 ms, dependendo da espécie, podemos considerar que a membrana é polarizada instantaneamente pelo campo externo.

O modelo da casca dielétrica esférica é bastante útil para compreendermos os mecanismos da EC. Para fazermos previsões sobre o comportamento das células cardíacas, precisamos, no entanto, de um modelo que se aproxime mais da geometria destas células.

Modelo do esferóide prolato

Durante o desenvolvimento, as células cardíacas modificam sua forma de aproximadamente esférica (até 5 dias) para a forma de um paralelepípedo (adulto), passando por diversas fases intermediárias. A geometria mais versátil para um modelo que ainda permita uma solução analítica da equação de Laplace é a do esferóide prolato. Representaremos então cada célula por um esferóide de equação

$$x^2/a^2 + y^2/a^2 + z^2/c^2 = 1 \quad (6.6)$$

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

Um campo $\mathbf{E} = E_{ox} \mathbf{x} + E_{oy} \mathbf{y} + E_{oz} \mathbf{z}$ produz um potencial transmembrana V_m dado por (Klee & Plonsey, 1976):

$$V_m(x, y, z) \cong (E_{ox} x + E_{oy} y)A + (E_{oz} z)C \quad (6.7)$$

onde,

$$A = \{ 1 - 0,5 \varepsilon^{-2} + 0,25 (1-\varepsilon^2) \ln[(1-\varepsilon)/(1+\varepsilon)] / \varepsilon^3 \}^{-1} \quad (6.8)$$

$$C = \{ \varepsilon^{-2} + 0,5 (1-\varepsilon^2) \ln[(1-\varepsilon)/(1+\varepsilon)] / \varepsilon^3 \}^{-1} \quad (6.9)$$

$$\varepsilon = (1 - a^2 / c^2)^{1/2} \quad (6.10)$$

No ponto onde este potencial induzido é máximo, seu valor é :

$$V_{\max} = [(E_{ox}^2 + E_{oy}^2) a^2 A^2 + E_{oz}^2 c^2 C^2]^{1/2} \quad (6.11)$$

Restringindo o campo \mathbf{E} ao plano xz e definindo $\theta_o = \arctg(E_{ox}/E_{oz})$ temos :

$$V_{\max}(\theta_o, a, c) = E_o [a^2 A^2 \sin^2 \theta_o + c^2 C^2 \cos^2 \theta_o]^{1/2} \quad (6.12)$$

A e C são funções somente de ε que, por sua vez, é função de a e c , os semi-eixos maior e menor do esferóide. Para termos alguma idéia de como se comportam

estas funções, preferimos representá-las em gráficos com abcissa igual a c/a , que é uma variável mais intuitiva que ϵ (fig 6.2).

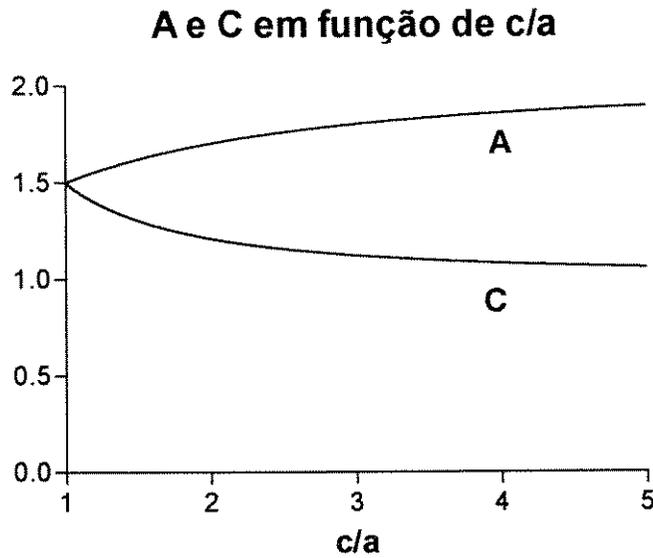


fig 6.2 - A e C em função de c/a , onde c e a são os comprimentos dos semi-eixos maior e menor da célula, respectivamente.

Podemos ver que as funções A e C tendem a $3/2$ quando c/a tende a 1, o que nos dá exatamente o resultado obtido com a esfera dielétrica.

Se o campo \mathbf{E} é paralelo a c , campo longitudinal, temos:

$$V_{\max}(0, a, c) = E_0 C c \quad \mathbf{E} \text{ longitudinal} \quad (6.13)$$

Se \mathbf{E} é perpendicular a c , campo transversal, temos:

$$V_{\max}(\pi/2, a, c) = E_0 A a \quad \mathbf{E} \text{ transversal} \quad (6.14)$$

Analisando a figura 6.2 e as equações (6.13) e (6.14), podemos ver que, se E é paralelo a c , então V_{\max} depende fortemente de c e levemente de a , aumentando quando c é fixo e a tende a c . Se E é perpendicular a c temos, ao contrário, V_{\max} dependendo fortemente de a e aumentando quando a é fixo e c aumenta. Assim, em ambos os casos V_{\max} aumenta com as dimensões da célula.

Se não estamos preocupados com a direção do campo aplicado, mas simplesmente com a estimulação da célula, o valor que nos interessa é uma média espacial de V_{\max} , que chamaremos de v_{\max} , dada pela integral de zero a $\pi/2$:

$$v_{\max} = 2E/\pi \int [a^2 A^2 \sin^2 \theta + c^2 C^2 \cos^2 \theta]^{1/2} d\theta \quad (6.15)$$

v_{\max} é, na média, o potencial V_{\max} gerado pelo campo em uma célula de semi-eixos a e c , se a direção do campo é aleatória com relação à orientação da célula.

6.3 - Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, divididos em cinco grupos das seguintes idades: adultos (4-6 meses); neonatos (3-6 dias); infantes (13-16 dias) e (20-21 dias) e jovens (28-35 dias). Todos os animais foram provenientes do biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB), da UNICAMP. Os animais foram

alojados em gaiolas coletivas recebendo água e ração “*ad libitum*” e não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

Soluções

A única solução utilizada nos experimentos foi a solução de Tyrode (140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM HEPES (N-2 Hydroxyethylpiperazine -N'-2 ethanesulfonic acid), 11 mM glicose, 1 mM CaCl₂, pH 7,4 a 23 °C).

Isolação

O procedimento utilizado em corações de animais de idade igual ou superior a 13 dias está descrito no capítulo 5 (Testes Biológicos). Para ratos neonatos utilizou-se o seguinte procedimento (Bassani & Bassani, 1997):

- após sacrifício por decapitação o coração era removido e lavado em solução de Krebs-Henseleit para isolação (KH-isol, apresentada no capítulo 5).
- os ventrículos eram cortados em pedaços e estes incubados a 37°C em solução de Tyrode para isolação (Ty-isol), contendo colagenase (0.7mg/ml, Worthington,USA) por 5 minutos.
- a seguir, os fragmentos eram transferidos para solução sem enzima, onde eram agitados por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a dissociação das células.
- os fragmentos eram transferidos novamente para a solução contendo enzima, e o procedimento repetido 3 vezes.
- as suspensões de células resultantes eram reunidas, e a concentração extracelular de Ca elevada para 1mM por meio de adições sucessivas de CaCl₂.

Câmara de Perfusão

Foi construída uma câmara de perfusão com algumas características peculiares que devem ser descritas (fig 6.3).

- a) Devido ao sistema de entrada da solução na câmara e de saída pela linha de vácuo, o fluxo sobre as células se mantém sempre laminar, o que facilita a adesão das células à lamínula. Isto é especialmente importante ao trabalharmos com células de animais jovens, que se aderem pouco ao fundo da câmara.
- b) A câmara possui uma armadilha para bolhas que evita problemas de turbulências e não inviabiliza o trabalho caso a solução de perfusão acabe momentaneamente no reservatório. O sistema de vácuo não seca o fundo da câmara no caso da interrupção do fluxo, o que causaria a morte instantânea das células.

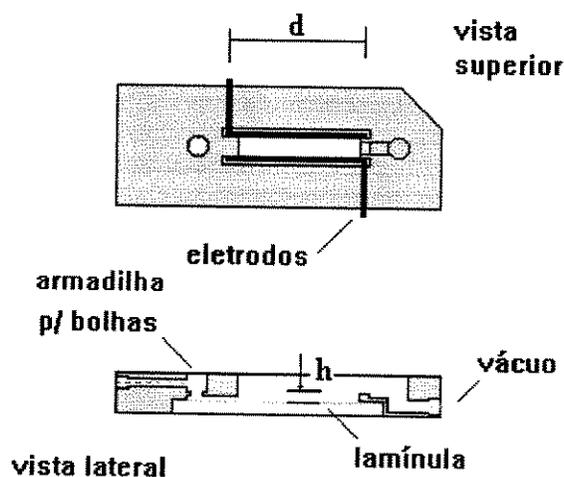
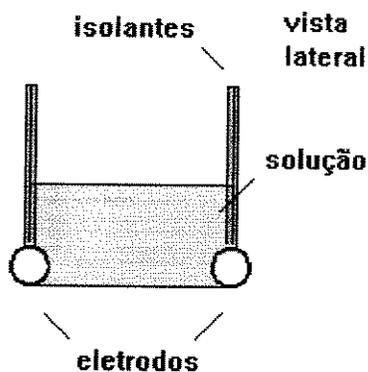


fig 6.3 - câmara de perfusão.

- c) Os eletrodos de estimulação (30 mm cada separados por 5 mm) são dispostos paralelos ao fluxo de solução, na lateral de toda câmara. Isto permite que em toda faixa central da câmara a densidade de corrente e, conseqüentemente o campo, sejam

aproximadamente constantes. A proximidade dos eletrodos permite a obtenção de campos altos com pequenas tensões, dado que o estimulador forneça corrente suficiente. Aproximando os eletrodos e o volume condutor por um capacitor de placas paralelas (fig 6.4), o campo elétrico na região central da câmara é dado por $E = I / h d \sigma$, onde I é a corrente em Ampères; h é a altura da solução (2,5mm); d é o comprimento dos eletrodos (30 mm) e σ é a condutividade da solução ($0,014 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$, medida em nosso laboratório). Assim temos $E(\text{V/cm}) \cong I(\text{A}) * 100$.



$$E (\text{V/cm}) \cong I (\text{A}) * 100$$

fig 6.4 - vista lateral da câmara de perfusão, mostrando a posição dos eletrodos e nível da solução fisiológica. O campo elétrico no centro da câmara pode ser aproximado pela equação apresentada na parte inferior da figura.

Estimuladores Elétricos

Utilizamos dois tipos de estimuladores, ambos projetados e construídos no nosso laboratório. O primeiro tipo é um estimulador convencional que alcança tensões da ordem de 30V e limite de corrente em 0,1 Ampère. Este estimulador mostrou-se útil no trabalho com células de animais adultos e de 30 dias, mas não foi capaz de

estimular células de animais mais jovens. Construímos então um estimulador mais robusto, capaz de realizar esta tarefa. Este estimulador é baseado na descarga de um capacitor, chaveada por um MOSFET (gentilmente cedido pelo Prof. J.A. Pomiglio - FEEC, UNICAMP). O capacitor é alimentado pela saída de um Variac retificado por uma ponte de diodos. O Mosfet é controlado por um pequeno estimulador alimentado à pilha. Obtivemos com este estimulador tensões de até 300V e corrente de 5 Ampères, valores mais que suficientes para estimular células de qualquer idade.

Definição de Limiar

Optamos por definir o campo limiar, E_L , como o maior campo insuficiente para estimular uma célula quando a intensidade do estímulo é gradualmente reduzida, durante estimulação regular. Este critério de obtenção do limiar traz resultados mais reprodutíveis do que os obtidos se definíssemos limiar como o campo necessário para iniciar atividade contrátil a partir do repouso. Acreditamos que as condições de equilíbrio estabelecidas na estimulação regular deixam o conteúdo citosólico de Ca, para uma dada frequência, aproximadamente no mesmo valor de célula para célula. O conteúdo intracelular de Ca, por influir na distribuição de cargas elétricas fixas na membrana celular (Bers, 1991), pode ser determinante do valor de campo necessário para a estimulação. Chamamos de potencial limiar (V_L) o valor máximo do potencial de membrana (V_{max}) quando o campo elétrico aplicado é E_L .

Análise dos dados

Os dados estão apresentados como médias \pm erros padrões ou limite do intervalo de confiança para 95% (para dados com distribuição normal originalmente

ou após transformação), ou como mediana com o limite do percentil para 75% (para dados que não apresentaram distribuição normal). Os dados de limiar, por apresentarem distribuição log-normal, foram convertidos a logaritmos decimais, antes de serem comparados por análise de variância mono e bifatorial. Neste caso, os contrastes foram comparados *post-hoc* pelo teste de Student-Newman-Keuls. Para estes dados estão apresentados os anti-logs das médias e dos limites dos intervalos de confiança para 95%. Os mesmos testes foram utilizados para *c/a*, que apresentaram distribuição normal.

Os dados de V_L e de dimensões celulares não apresentaram distribuição normal e foram, portanto, comparados pela análise de variância de Kruskal-Wallis (não paramétrica), utilizando-se o teste de Dunn para comparação dos contrastes. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

6.4 - Resultados

Geometria das células

A morfologia das células cardíacas modifica-se drasticamente durante o desenvolvimento pós-natal. As células de animais de 3 a 6 dias são, na sua maioria, esféricas, com diâmetros em torno de 8 a 15 μm , e sem organização aparente dos miofilamentos. Podemos, no entanto, encontrar algumas células com razão $c/a \cong 2$ ou 3 e já alguma estriação, mostrando um esboço de alinhamento dos sarcômeros.

Animais em torno de 14 dias de idade tem a maior variedade de tipos de células. Encontramos células esféricas pequenas, como as dos animais neonatos, células esféricas grandes, ainda sem organização interna, células com $c/a \cong 3$ com e sem

estriações definidas e ainda células longas ($c/a \cong 4$) com miofilamentos bastante definidos.

Células de animais de 21 dias são na maioria estriadas e longas ($c/a \cong 4$), mas suas extremidades ainda são arredondadas.

Animais de 30 dias possuem células bastante afinadas ($c/a \sim 5$) com extremidades em ângulos retos e organização sarcomérica como a das células de adultos (ver fig 1.3).

Em geral, parece que, durante o desenvolvimento, a célula cresce na direção longitudinal enquanto seus miofilamentos se organizam, até aproximadamente 20 ou 30 dias. A partir deste ponto ela começa então a crescer relativamente mais na sua direção transversal (células de adultos tem em média $c/a \sim 4$).

Estas observações foram feitas em células que sofreram um procedimento de isolamento agressivo e não podemos afirmar que no coração intacto elas sejam válidas.

A fig 6.5 ilustra os parâmetros $2a$, $2c$ e c/a para as células que efetivamente foram estimuladas nos experimentos. É importante frisar que nem todas as células com aparência saudável eram estimuláveis, apesar de podermos obter campos altíssimos com nosso estimulador. Em animais mais jovens, por exemplo, o número de células estimuláveis era muito inferior ao número de células de boa aparência (~ 1 para 10). Nos adultos, esta relação subia para aproximadamente 1 para 2.

O teste de Kruskal-Wallis revela que houve influência significativa da idade ($P < 0,001$) sobre as dimensões celulares, tanto no eixo maior quanto no eixo menor. No eixo maior, células de animais jovens apresentaram dimensão menor ($P < 0,05$) do que as de adultos, exceto aos 30 dias de idade, quando esta diferença não foi

significativa. O mesmo foi observado com relação ao eixo menor. Diferença significativa ($P < 0,05$) com a idade também foi observada com relação a c/a .

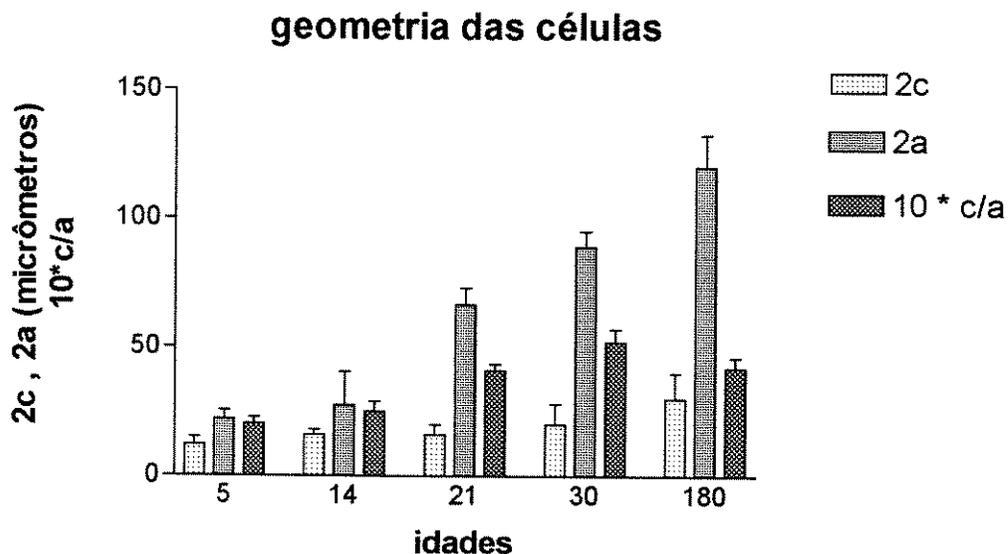


fig 6.5 - Geometria das células estimuladas. Animais: ratos de 5 a 180 dias de idade. Fatores geométricos: Eixo maior ($2c$), eixo menor ($2a$) e razão entre os eixos (c/a). Para as duas primeiras variáveis, estão apresentadas as medianas e as linhas indicam o limite do percentil para 75%. Para c/a (que apresentou distribuição normal), as barras representam as médias, e as linhas, os erros-padrões.

Limiar versus Idade

A fig. 6.6 ilustra como o limiar de estimulação varia com a idade dos animais, sem levar em conta a geometria de cada célula e da orientação relativa do campo. Podemos observar que, em média, o limiar para o animal recém nascido é aproximadamente 5 vezes maior que para o adulto. Entre a célula de neonato de limiar mais alto ($\sim 45V/cm$) e a de adulto de limiar mais baixo ($\sim 3V/cm$) temos um fator 15.

A análise de variância revelou que o limiar é significativamente reduzido ($P < 0,001$) com o amadurecimento do animal, até atingir valores estatisticamente não diferentes dos adultos, aos 30 dias de idade.

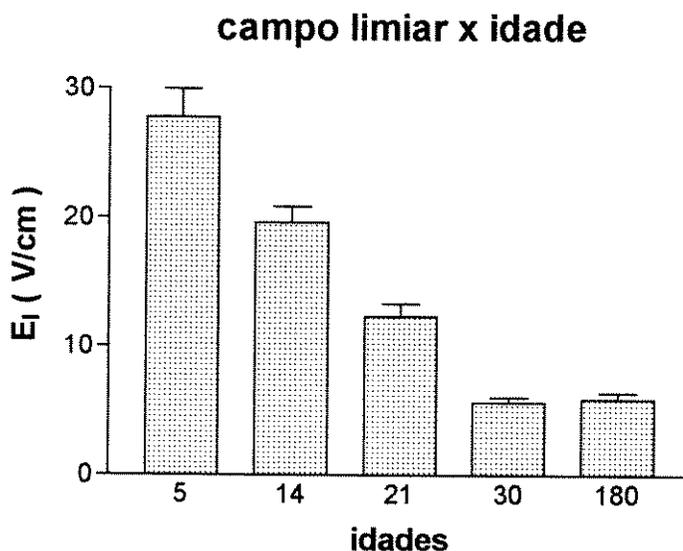


fig. 6.6 - Médias do campo limiar (E_L) obtido para as células de ratos de diversas idades (de 5 a 180 dias). As linhas verticais indicam os limites superiores dos intervalos de confiança para 95%.

Cálculo da despolarização da membrana no limiar, V_L .

A partir da geometria de cada célula, da intensidade e direção do campo nela aplicado calculamos o seu V_L dado pela equação (6.12).

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que V_L foi significativamente ($P < 0,001$) afetado pela idade. Este resultado foi causado pela diferença dos valores obtidos para a idade de 30 dias que foram significativamente menores que aqueles das idades de 5 a 21 dias. Quando comparados com todos os outros grupos o grupo de 180 dias não apresentou diferença significativa no teste para comparação de contrastes.

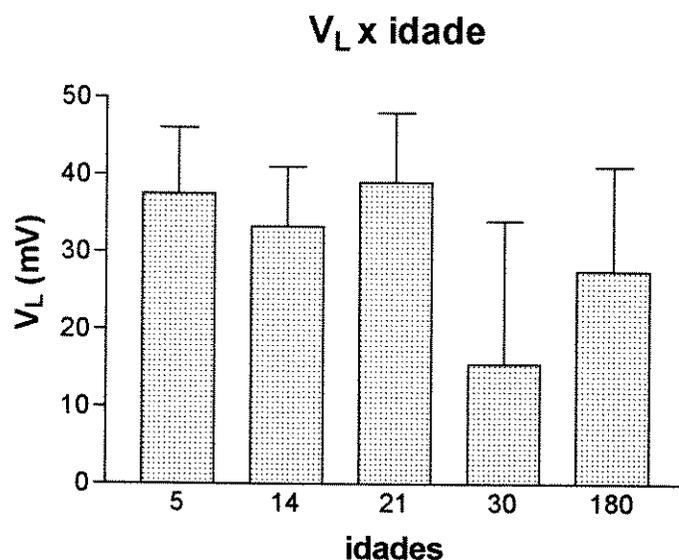


fig. 6.7 - medianas dos valores de V_L calculados para células de ratos de diversas idades (entre 5 e 180 dias), a partir da geometria de cada célula, da intensidade e da direção do campo aplicado. As linhas verticais indicam os percentis para 75%.

Obtivemos também os valores de v_L (v_{max} para o campo limiar médio) a partir da equação 6.15 para uma célula fictícia de cada idade. Para tal utilizamos os valores médios de a , c e E_L de cada grupo. Na tabela 6.1 mostramos estes resultados, bem como todos os outros apresentados nas três figuras acima.

Tabela 6.1 - resumo dos resultados das 3 figuras acima.

| idade (dias) | $2c$ (μm)** | $2a$ (μm)** | c/a * | E_L (V/cm)* | V_L (mV)* | v_L (mV) | N |
|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|------------|----|
| 5 | 22 (22-26) | 12 (10-15) | $2,0 \pm 0,2$ | 29 ± 2 | 38 (31-46) | 37 | 21 |
| 14 | 28 (25-41) | 16 (14-18) | $2,5 \pm 0,4$ | 21 ± 1 | 33 (28-40) | 35 | 23 |
| 21 | 67 (62-73) | 16 (15-20) | $4,1 \pm 0,3$ | 13 ± 1 | 39 (21-48) | 35 | 22 |
| 30 | 89 (75-95) | 20 (13-28) | $5,2 \pm 0,5$ | $5,9 \pm 0,4$ | 16 (10-35) | 19 | 22 |
| 180 | 120 (110-130) | 30 (25-40) | $4,2 \pm 0,4$ | $6,3 \pm 0,5$ | 28 (17-41) | 31 | 24 |

* média \pm EPM; ** mediana (percentil 25%-percentil 75%)

Limiar para os campos longitudinal e transversal ao eixo maior de células em diferentes grupos etários

Para cada idade, escolhemos células que estavam alinhadas paralela ou perpendicularmente ao campo elétrico. Como o nosso aparato experimental não permitia a mudança da orientação do campo com relação à célula, não pudemos testar o limiar nas duas direções para a mesma célula. Em cada idade testada, os valores médios de a e c foram semelhantes nas duas orientações de campo.

Na tabela 6.2 estão apresentados os resultados obtidos, bem como a razão entre as médias nas duas direções para cada idade.

Tabela 6.2 - Limiar de estimulação com campo longitudinal e transversal.

| idade (dias) | campo trans | | campo long | | long/trans |
|--------------|---------------|---|---------------|---|------------|
| | limiar (V/cm) | N | limiar (V/cm) | N | |
| 5 | 33 ± 4 | 6 | 24 ± 3 | 3 | 0,72 |
| 14 | 24 ± 2 | 8 | 17 ± 4 | 3 | 0,70 |
| 21 | 16 ± 2 | 5 | 8,9 ± 0.9 | 4 | 0,56 |
| 30 | 9,0 ± 0.2 | 4 | 4,5 ± 0.3 | 7 | 0,50 |
| 180 | 9,0 ± .09 | 6 | 3,9 ± 0.4 | 6 | 0,43 |

Podemos ver na fig. 6.8 que em cada idade, o limiar mostrou-se sempre inferior no campo longitudinal. A análise de variância bifatorial revelou que tanto a idade, quanto a orientação do campo afetaram significativamente ($P < 0,001$) o limiar

estimulatório. No entanto, estes efeitos foram independentes, a julgar pela ausência de interação significativa ($P > 0,05$) destes fatores.

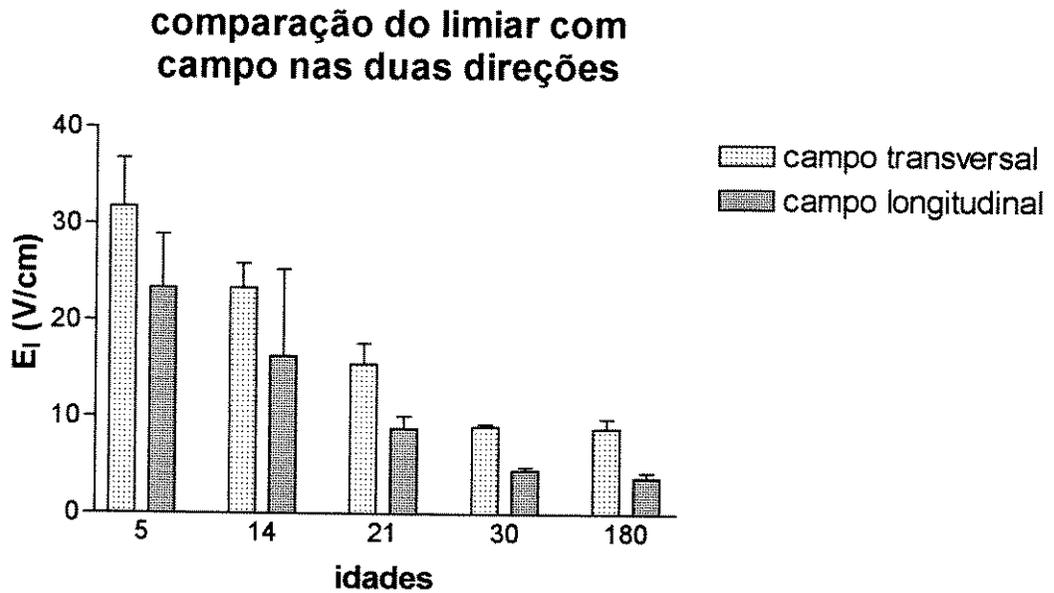


fig. 6.8 - comparação do campo limiar (E_L) longitudinal (paralelo a c) e transversal (perpendicular a c) para células de ratos de diversas idades.

Comparação da curva teórica obtida a partir das equações 6.13 e 6.14 com dados experimentais.

Das equações (6.13) e (6.14) podemos concluir que no limiar temos:

$$E_L = V_L / C c \quad \text{para campo longitudinal}$$

$$E_L = V_L / A a \quad \text{para campo transversal}$$

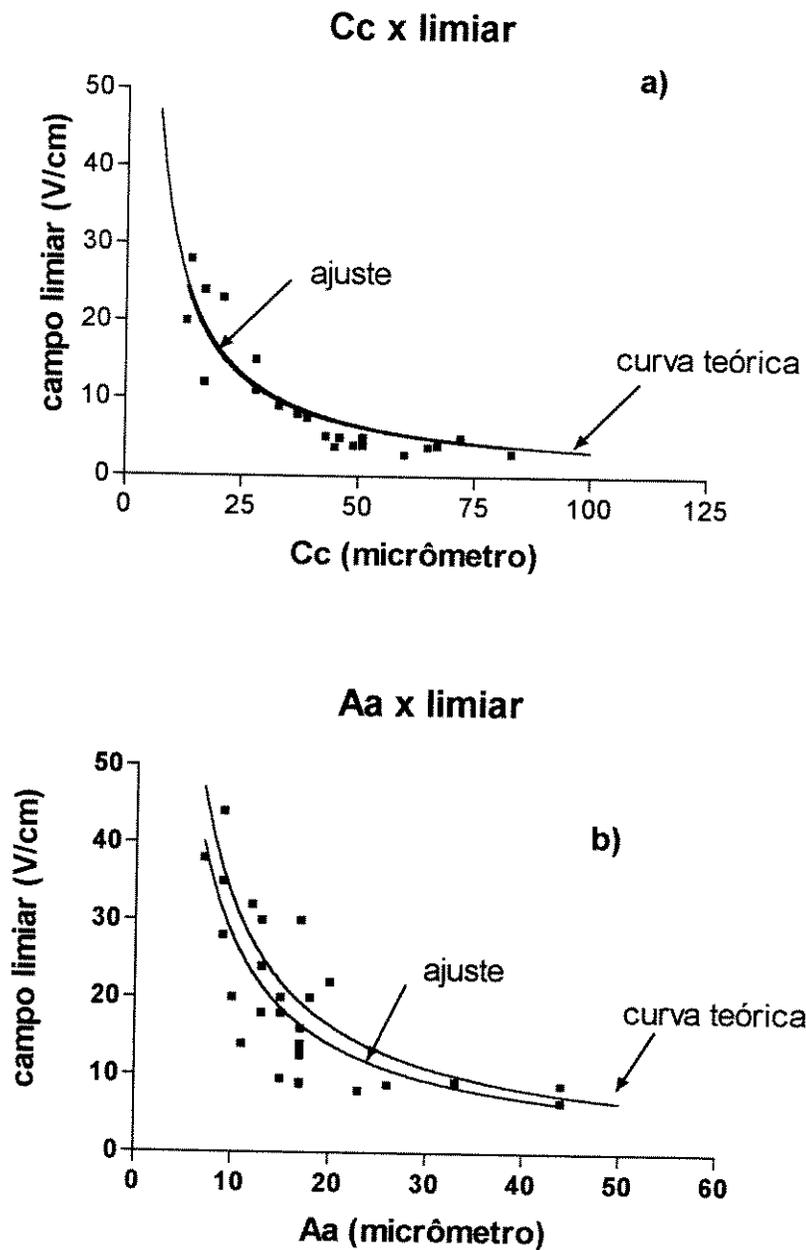


fig 6.9 a) limiar *versus* Cc para campo longitudinal e b) limiar *versus* Aa para campo transversal.

Para cada célula orientada paralela ao campo, calculamos, usando seus valores de a e c , os valores da função C . Nas figura 6.9a apresentamos E_L como função de Cc para cada uma das células nesta condição. Utilizando o valor médio de V_L para

todas as células em qualquer direção de campo (33mV), podemos construir uma curva teórica mostrada também na figura 6.9a:

$$E_L (\text{V/ cm}) = F * 33 (\text{ mV}) / C c (\mu\text{m})$$

onde $F = 10$, é somente um fator de correção das unidades.

Na figura 6.9a temos também a curva gerada a partir do ajuste dos pontos a uma função hiperbólica. Os resultados do ajuste mostram que, para o primeiro caso, os pontos são bem descritos por uma hipérbole ($R^2 = 0,80$), e que o valor de V_L médio para todas as células, 33mV, é semelhante ao aqui obtido (31,8 mV) e encontra-se dentro do intervalo de confiança 95% (27,7 - 35,9 mV).

O mesmo procedimento foi aplicado às células orientadas perpendicularmente ao campo e os resultados apresentados na figura 6.9b. Como pode ser observado na figura, os resultados não são tão bons: $R^2 = 0,60$, $V_L = 28,1$ com intervalo de confiança 24,7 - 31,5 .

6.5 - Discussão e conclusões

Limiar *versus* idade

O primeiro ponto que gostaríamos de discutir está relacionado a um aspecto prático: como estimular células de animais jovens para estudar sua fisiologia? Na figura 6.6 podemos observar que o campo necessário para estimulação de células de animais neonatos é cerca de 5 a 6 vezes maior do que o necessário para adultos. À primeira vista, este fator não deveria representar um grande problema pois, trabalhando com células de animais adultos, opera-se bem abaixo dos limites máximos

dos estimuladores. Não obstante, trabalhamos durante vários meses sem sucesso. A causa da dificuldade é, na realidade, a relação entre potência do estimulador e campo aplicado. Para uma dada geometria de câmara e eletrodos, a potência exigida do estimulador é proporcional ao quadrado do campo ($P \propto E^2$). Assim, para um campo 5 a 6 vezes maior necessitamos de um estimulador aproximadamente **30 vezes** mais potente. Esta talvez seja a razão da escassez de trabalhos na literatura com células de animais neonatos submetidas a estimulação por campo (Chin et al., 1990).

Despolarização da membrana no limiar

Da figura 6.7 podemos ver que, dos cinco grupos etários, quatro apresentaram valores de V_L muito próximos, em torno de 35 mV. Este valor corresponde à mudança do potencial de membrana de -85mV (assumido como potencial de repouso) para -50mV que está dentro dos limites para ativação submáxima dos canais de Na^+ dependentes de potencial (pico de ativação por volta de -30mV no coração humano, Hille, 1992) e disparo de PA. No grupo de animais de 30 dias, no entanto, V_L foi significativamente menor do que o obtido nos outros grupos. Esta variação provavelmente se deve, a nosso ver, à inadequação do modelo do esferóide prolato para estas células. Na figura 6.5, podemos observar que c e a crescem monotonicamente com a idade, mas c/a , ao contrário, atinge um pico no grupo de 30 dias. Durante os experimentos observamos também que as células deste grupo tinham as extremidades mais retas, sendo as que mais se afastavam do modelo adotado. É sabido da Teoria Eletromagnética (Lorrain & Corson, 1988) que em extremidades anguladas os campos podem assumir valores extremamente elevados, aumentando com a diminuição do raio de curvatura. Acreditamos que estas extremidades com

cantos bem pronunciados permitem que com um menor campo externo seja gerado o V_L necessário para a abertura dos canais de Na^+ .

Ao calcularmos v_L , queríamos mostrar que este valor, derivado dos valores médios de E_L , c e α obtidos com as células de cada idade, aproxima-se muito ao valor médio de V_L . Podemos então utilizar a equação 6.15 para estimar o campo que será necessário, em média, para estimular uma população de células, se conhecermos suas dimensões e assumirmos que a despolarização de 35mV seja suficiente para ativar canais de Na^+ , de modo a atingir o limiar.

Limiar para os campos longitudinal e transversal ao eixo maior de células em diferentes grupos etários

Na figura 6.9 podemos observar um efeito previsto pela teoria, também já descrito experimentalmente na literatura para animais adultos (Ranjan & Thakor, 1994). Apesar de não termos podido medir o limiar nas duas direções na mesma célula, devido às nossas limitações experimentais, vê-se claramente que, independentemente da idade, o limiar com campo paralelo a c é sempre menor que com o campo perpendicular.

Calculando, a partir dos dados de Ranjan & Thakor (1995), a razão entre os campos nas duas direções em células cardíacas de cães adultos, obtemos $0,39 \pm 0,05$ em 7 células. Neste estudo, com células de ratos adultos, obtivemos um valor bastante próximo, de $0,4 \pm 0,1$ em 6 células.

Limiar para campo longitudinal e transversal independente da idade

O modelo parece bastante razoável pelo menos com relação a Cc, contudo, não conseguimos estimular nenhuma célula com $c < 15\mu\text{m}$ ou $a < 9\mu\text{m}$ apesar de podermos obter campos 10 vezes maiores que o campo máximo utilizado. Uma questão que se coloca neste ponto é a respeito da existência ou não de células efetivamente não excitáveis (e.g. células em processo de diferenciação que eventualmente não tivessem disponível, ainda, aparelho contrátil suficientemente desenvolvido para produzir contração detectável). Com os nossos dados não seria possível concluir definitivamente sobre este assunto, já que para isto seria necessário medir simultaneamente à estimulação o potencial de ação. Outra possibilidade seria a presença células cromafins intracardíacas, de morfologia e dimensões semelhantes aos miócitos, presentes desde o período fetal (Huang et al., 1996).

Poderia-se especular sobre as implicações fisiológicas das diferenças de limiar dependentes da idade. Por exemplo, até que ponto o alto limiar observado em células isoladas de animais neonatos poderia dificultar o processo de condução da excitação no tecido cardíaco, especialmente considerando-se a alta frequência cardíaca apresentada por animais neonatos. Se, por um lado, a baixa excitabilidade elétrica da célula do neonato poderia sugerir dificuldade de excitação por miócitos adjacentes, por outro, poderia haver mecanismos compensatórios no processo de condução. Angst et al. (1997) estudaram, durante o desenvolvimento pós-natal, a distribuição celular de conexina-43, a principal proteína envolvida na formação de canais das junções *gap* no coração do rato, através das quais ocorre a comunicação elétrica intercelular no coração (Bers, 1991). Angst et al. (1997) observaram que, em neonatos, conexina-43 distribui-se homogeneamente em toda a membrana do miócito,

enquanto que, no animal adulto, a proteína (e conseqüentemente, as junções) situa-se apenas nos polos da célula, na região dos discos intercalados. Esta ampla distribuição de junções *gap* nos miócitos de neonatos, em tese, permitiria que uma dada célula pudesse ser excitada por qualquer célula adjacente. Devido às pequenas dimensões do miócito do neonato, isto poderia representar a possibilidade de somação espacial, o que, certamente, facilitaria a despolarização até o potencial limiar.

Finalmente concluímos que o modelo adotado é capaz de descrever de maneira bastante razoável os dados experimentais obtidos. As concordâncias entre experimento e teoria são surpreendentes e os desvios observados podem ser explicados de modo satisfatório. Isto nos permite avançar na compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos no primeiro passo do Acoplamento Excitação Contração, apoiados por uma teoria sólida e poderosa como a Teoria Eletromagnética.

Capítulo 7

“Transiente de Ca^{2+} em Miócitos Cardíacos Isolados: Parâmetros de Calibração e Características dos Transientes para Diversas Idades.”

7.1 - Introdução

O primeiro passo no estudo da dinâmica do cálcio em células cardíacas durante o desenvolvimento pós-natal é o conhecimento da faixa de variação da concentração intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cada idade. Para que medições quantitativamente confiáveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sejam feitas, é fundamental que seja obtida a calibração *in vivo* do indicador fluorescente utilizado (Morgan et al., 1993; Bassani *et al.*, 1995). Os parâmetros de calibração do indicador dependem fortemente da composição do meio no qual ele se encontra (Westerblad & Allen, 1996; Konishi et al., 1988; Hove-Madsen & Bers, 1992). Assim, como as células cardíacas se modificam muito durante o desenvolvimento (Mahony, 1996), é possível que os parâmetros de calibração não sejam os mesmos em idades diferentes. A calibração é fundamental para que obtenhamos valores confiáveis para a faixa de variação e curso temporal do transiente em idades diferentes.

O objetivo deste capítulo foi estudar, em miócitos cardíacos de ratos, a faixa de variação do Ca^{2+} intracelular durante a contração ao longo do desenvolvimento pós-natal dos animais. Para tanto, foi necessária a isolamento de células de animais de 4 grupos etários: 3 a 6 dias, 13 a 16 dias, 28 a 35 dias e animais adultos. Construímos uma câmara de perfusão e um estimulador que, juntos, possibilitaram a geração dos campos necessários para estimular células de qualquer idade. Foi desenvolvida uma metodologia para a obtenção dos parâmetros de calibração, utilizando os próprios mecanismos celulares de regulação do Ca^{2+} e, assim, minimizando o uso de fármacos que poderiam perturbar as medições. Para cada grupo, determinamos R_{\min} , R_{\max} e β , comprovando nossa hipótese inicial de que estes parâmetros não se mantêm constantes durante o desenvolvimento do animal. Foram obtidos então os transientes de cálcio em diversas células de cada grupo, de modo a termos valores médios da concentração de Ca^{2+} “diastólica” ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{diast}}$) e de pico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{pico}}$), e da largura a meia altura do transiente (fwhm) para as diversas idades.

7.2 - Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, divididos em quatro grupos etários: neonatos (3-6 dias), infantes (13-16 dias), jovens (28-35 dias) e adultos (4-6 meses). Todos os animais foram provenientes do biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas recebendo água e ração “*ad libitum*” e não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

Soluções

As soluções utilizadas nos experimentos foram baseadas na solução de Tyrode (140 mM NaCl; 6 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 5 mM HEPES (N-2 hidroxietilpiperazina -N'-2-ácido etanesulfônico); 11 mM glicose e 1 mM CaCl₂, pH 7,4 a 23 °C. Para a estimulação das células usamos a solução descrita acima (Tyrode normal). Utilizamos também, durante o procedimento de calibração *in vivo*, soluções modificadas como a solução mínimo, Ty-mínimo, (140 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; 11 mM glicose e 3 mM EGTA (etileno glicol-bis[β-aminoetilether]-N,N,N',N'-ácido tetraacético), pH 7,2 a 23 °C), contendo ou não 10 mM cafeína; e solução máximo, Ty-máximo, (140 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 5 mM HEPES; 11 mM glicose; 3 mM EGTA e 10 mM CaCl₂; pH 7,4 a 23°C).

Isolação de células

O procedimento utilizado em corações de animais de idade igual ou superior a 13 dias foi como o descrito no capítulo 5.

Para ratos neonatos, utilizou-se o procedimento descrito a seguir (Bassani & Bassani, 1997):

- após sacrifício por decapitação, o coração foi removido e lavado em solução de Krebs-Henseleit para isolação;
- os ventrículos foram cortados em pedaços e estes incubados a 37°C em solução de Tyrode para isolação (Ty-isol), contendo colagenase (0.7 mg/ml, Worthington, USA) por 5 minutos;

- a seguir, os fragmentos foram transferidos para solução sem enzima, onde eram agitados por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a dissociação das células;
- os fragmentos foram transferidos novamente para a solução contendo enzima, e o procedimento repetido 3 vezes;
- as suspensões de células resultantes foram reunidas, e a concentração extracelular de Ca^{2+} elevada para 1mM por meio de adições sucessivas de CaCl_2 .

Câmara de Perfusão e Estimuladores Elétricos

A câmara e os estimuladores elétricos utilizados foram os mesmos descritos no capítulo 6 deste trabalho.

Calibração *in vivo*

Este procedimento teve como objetivo a determinação dos parâmetros de calibração (R_{\min} , R_{\max} e β) que foram utilizados na conversão dos sinais obtidos com o indicador fluorescente indo-1 para $[\text{Ca}^{2+}]$.

Basicamente esperávamos poder atingir os dois limites R_{\min} e R_{\max} utilizando os próprios mecanismos de transporte de cálcio da célula. Assim, para a obtenção de R_{\min} , perfundimos as células com solução Ty-mim, a qual, além de não conter Ca^{2+} , tem em sua composição 3mM de EGTA, um quelante de Ca^{2+} . A presença deste quelante garante a redução do cálcio contaminante nesta solução para níveis nanomolares. Com a concentração extracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ nestes níveis, o potencial de reversão da troca Na/Ca atinge um valor positivo alto, o que implica em grande favorecimento termodinâmico da extrusão de cálcio do meio intracelular. Este

procedimento sozinho não seria suficiente para trazer os valores de cálcio a um mínimo num período razoável para um experimento, pois vazamento de Ca^{2+} do RS poderia manter o nível citosólico do íon alto por muitas horas. Utilizamos, então, aplicação rápida de cafeína para liberar o cálcio estocado no RS. Sabemos, no entanto (Bassani et al., 1993), que parte do cálcio liberado pelo RS é captado pelas mitocôndrias, podendo subsequentemente retornar lentamente ao RS. Mantivemos então a perfusão com Ty-min por mais 10 minutos e aplicamos um segundo pulso de cafeína. Após mais 10 minutos de perfusão, medimos R_{\min} .

A razão R logo após o segundo pulso de cafeína se mostrou sempre maior (~ 7%) que R_{\min} medido, indicando que, até aquele ponto, não se havia alcançado o objetivo de minimizar $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Para 3 células de cada grupo, fizemos um terceiro pulso de cafeína seguido de mais 10 minutos de perfusão com Ty-min. A razão medida após este teste flutuava (para cima e para baixo) ligeiramente em torno de R_{\min} medido, indicando que o procedimento tinha chegado ao seu limite.

Para a obtenção de R_{\max} , foi utilizada a solução Ty-max que, além de conter 10mM de Ca^{2+} , continha também 140mM de K^+ . A presença desta alta concentração de potássio na solução extracelular resulta em despolarização da membrana para níveis próximos a 0 mV. Isto levaria a, além da abertura dos canais de Na^+ e Ca^{2+} seguida de inativação dependente do tempo, uma forte reversão da troca Na/Ca, transportando Ca^{2+} para dentro da célula em grande quantidade. Este processo culminava com uma contratura irreversível da célula seguida de morte. Durante a contratura, as fluorescências e a razão eram medidas continuamente. A razão descrevia uma curva bem próxima de uma sigmóide, com drástica redução da razão

sinal/ruído após alcançado o platô por alguns segundos. Esta diminuição parece ser devida à atenuação do sinal de fluorescência causada pela perda do indicador.

Em resumo, para células de animais de cada grupo seguimos o seguinte protocolo:

- a) procedimento de isolamento e carregamento com indo-1;
- b) estimulação elétrica das células para obtenção de transientes de Ca^{2+} para algumas delas;
- c) troca da solução de perfusão para Ty-min;
- d) após 10 min, um pulso de 10 mM cafeína e retorno a Ty-min;
- e) após 10 min, o segundo pulso de cafeína e retorno a Ty-min;
- f) após 10 minutos, obtenção de R_{\min} para diversas células;
- g) após a escolha de uma célula com sinal alto, mudança da solução para Ty-max e registro contínuo das fluorescências;
- h) após a saturação dos *buffers* internos, a célula desenvolve contratura e atividade espontânea;
- i) após análise do sinal gravado, obtenção da razão máxima R_{\max} ;
- j) a partir dos transientes obtidos, determinar β usando o procedimento descrito no sub-ítem **Medindo β com maior acurácia** da secção 2.2.

O parâmetro de calibração β usado para cada grupo foi a média dos valores de β obtidos em várias células. Já os valores de R_{\min} e R_{\max} são os limites inferior e superior, respectivamente, dos intervalos de confiança para 95% da população medida, como discutido no sub-ítem propagação de erros, do ítem 2.2.

Determinação da faixa de variação do cálcio intracelular

Cada célula era estimulada com tensão 1,5 vezes maior que o limiar até que o estado estacionário fosse atingido. As fluorescências e o pulso de estimulação foram registrados. A razão das fluorescências foi convertida para valores de $[Ca^{2+}]_i$ usando os parâmetros de calibração determinados. A média de 5 transientes utilizando os pulsos de estimulação como referência temporal foi obtida.

O valor da concentração de pico ($[Ca^{2+}]_{pico}$), cálcio diastólico ($[Ca^{2+}]_{diast}$) e largura a meia altura (fwhm) dos transientes para uma dada idade é a média dos valores obtidos para cada uma das células.

Análise dos dados.

Os dados foram processados por análise de variância monofatorial. Os contrastes foram analisados por meio do teste de Student-Newman-Keuls. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados indicativos de significância estatística.

7.3 - Resultados

Parâmetros de Calibração

Seguindo o procedimento descrito na seção 7.2, obtivemos os valores mostrados na tabela 7.1.

Tabela 7.1 - média e erro padrão de R_{\min} , β e R_{\max} para as diversas idades. Entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95% .

| idade (dias) | R_{\min} | | beta | | R_{\max} | |
|-----------------|---|----|---|----|-------------------------------------|----|
| | m \pm SE (I.C. 95%) | N | m \pm SE (I.C. 95%) | N | m \pm SE (I.C. 95%) | N |
| 5 | 1.59 \pm 0.09 (1.41 - 1.79) | 20 | 3.3 \pm 0.2 (2.76 - 3.80) | 7 | 4.7 \pm 0.4 (3.9 - 5.5) | 11 |
| 14 | 1.43 \pm 0.04 (1.34 - 1.52) | 20 | 2.8 \pm 0.1 (2.76 - 3.80) | 11 | 4.0 \pm 0.3 (3.9 - 5.5) | 10 |
| 30 | 1.51 \pm 0.03 (1.45 - 1.56) | 21 | 2.23 \pm 0.07 (2.76 - 3.80) | 8 | 3.4 \pm 0.2 (2.4 - 3.8) | 7 |
| 180 | 1.43 \pm 0.03 (1.45 - 1.56) | 14 | 2.25 \pm 0.05 (2.14 - 2.37) | 10 | 3.4 \pm 0.1 (2.4 - 3.8) | 7 |

Da análise de variância pudemos concluir que, apesar dos valores de R_{\max} e β serem afetados pela idade do animal ($P < 0,05$), R_{\min} não apresentou variação estatisticamente significativa. Do teste de contraste podemos concluir que nenhum dos parâmetros se modifica significativamente entre os grupos de 30 e 180 dias.

Como discutido na secção material e métodos optamos por adotar como parâmetros de calibração a média de β e os extremos dos intervalos de confiança para R_{\min} e R_{\max} (mostrados em negrito na tabela 7.1).

A fig 7.1 mostra os valores médios e erros padrões de R_{\min} , β e R_{\max} .

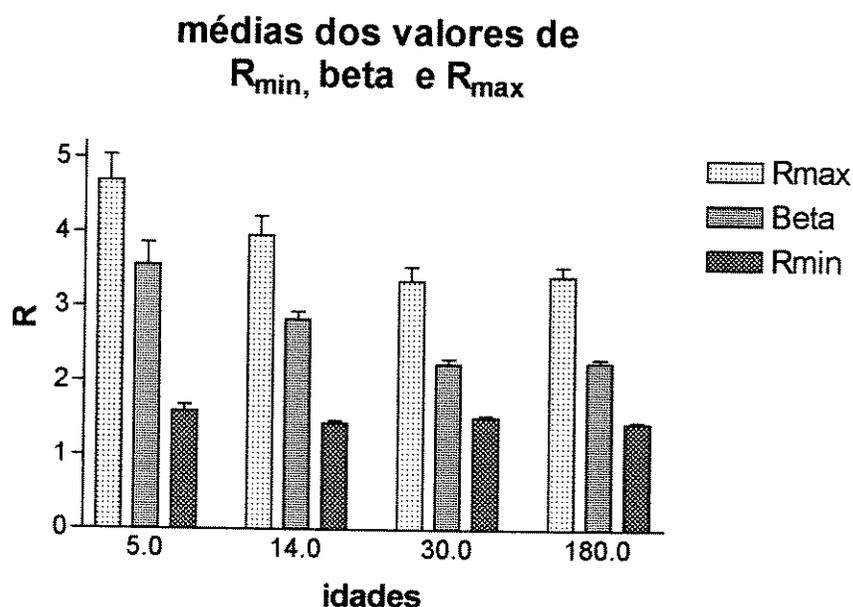


fig 7.1 - média dos valores de R_{\max} , β e R_{\min} para os quatro grupos.

Características dos transientes nas diversas idades

Uma vez com os parâmetros de calibração disponíveis, convertamos os registros obtidos de R para $[Ca^{2+}]_i$, obtendo as curvas das fig. 7.2 a, b, c e d. Utilizamos como K_d o valor $0.844 \mu M$, determinado *in vivo* (Bassani et al., 1995).

O aumento do nível de ruído em animais mais jovens parece ter sido devido à diminuição do tamanho da amostra onde a fluorescência foi medida. A área de uma célula de animais neonatos é tipicamente 10 vezes menor que a de um animal adulto e o sinal de fluorescência obtido acompanha aproximadamente este fator.

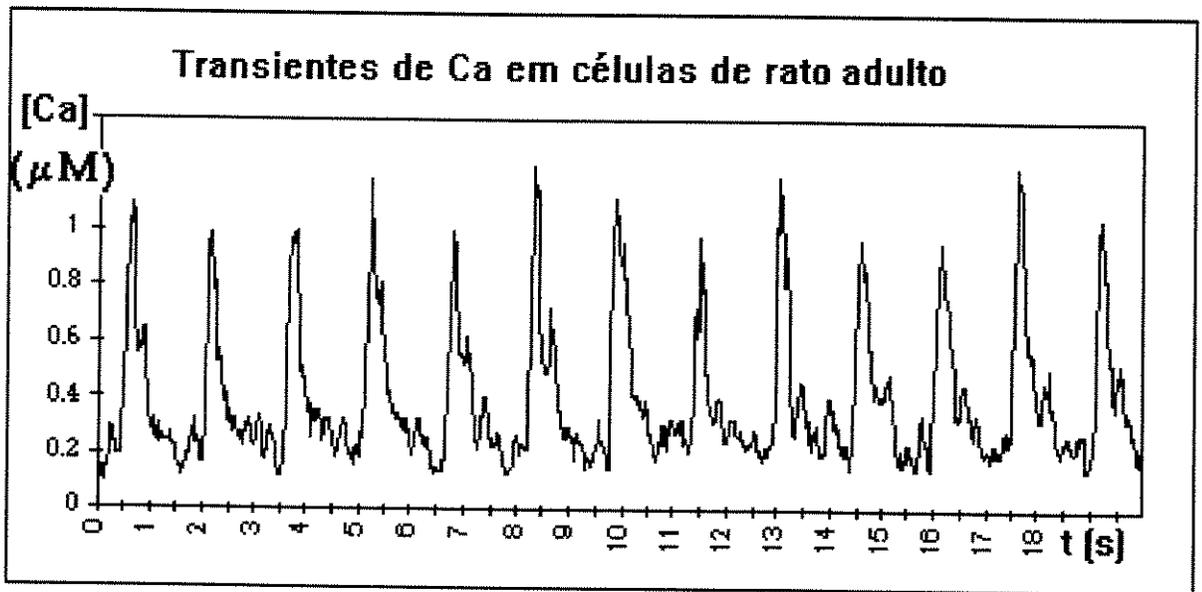


fig. 7.2a - transiente de cálcio em célula de rato adulto.

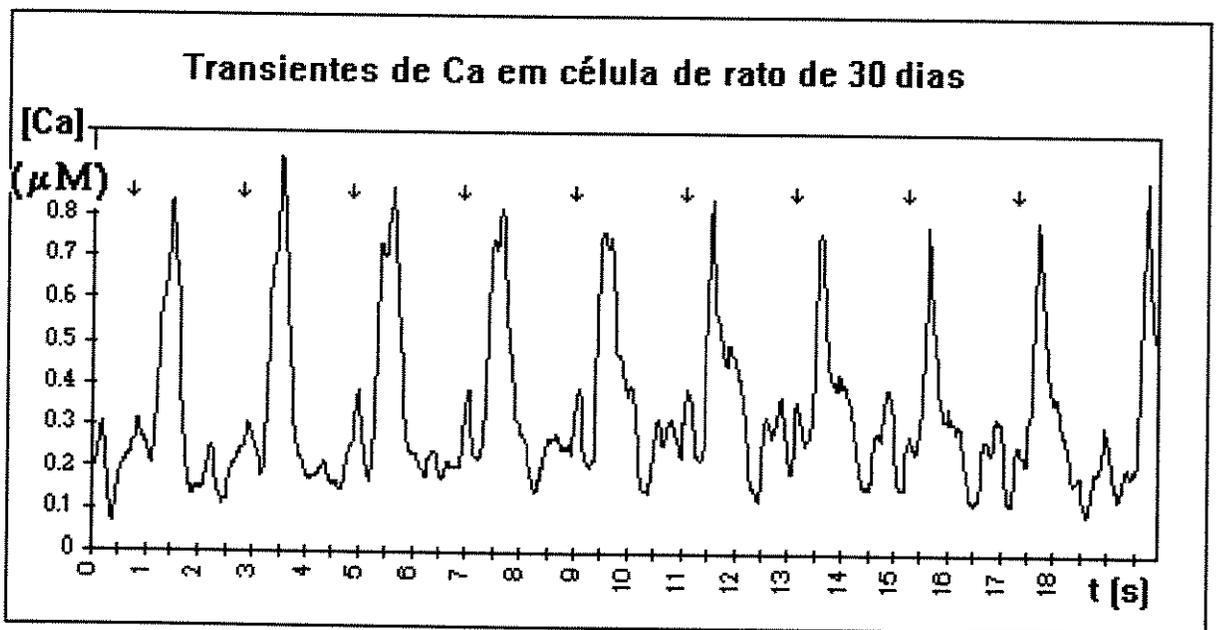


fig. 7.2b - transiente de cálcio em célula de rato de 30 dias. As setas indicam os instantes de aplicação dos estímulos.

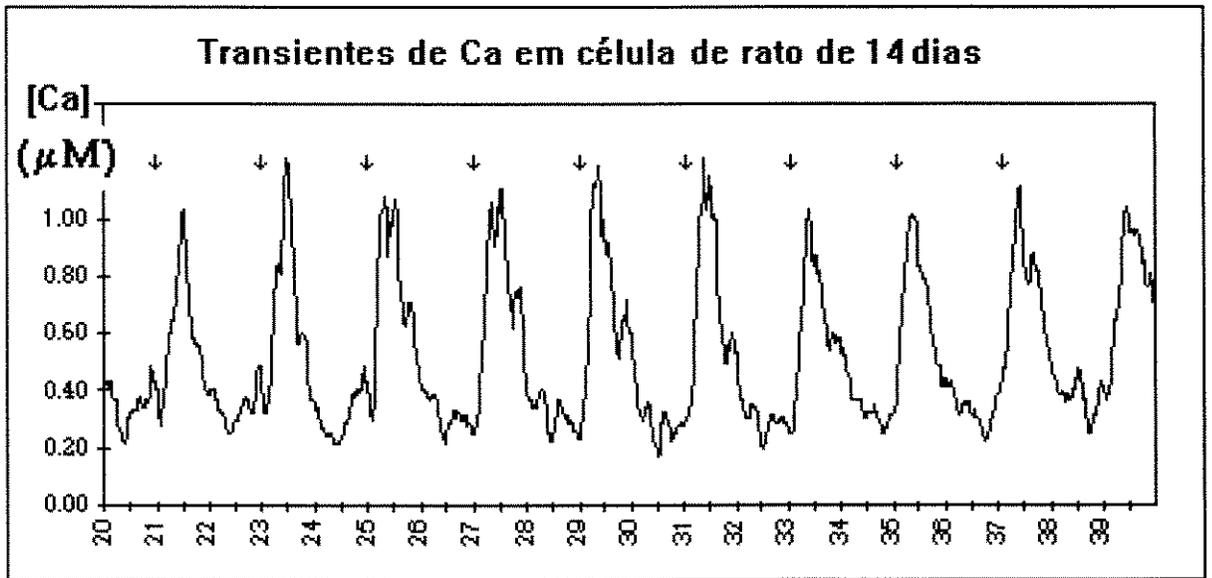


fig. 7.2c - transiente de cálcio em célula de rato de 14 dias. As setas indicam os instantes da aplicação dos estímulos.

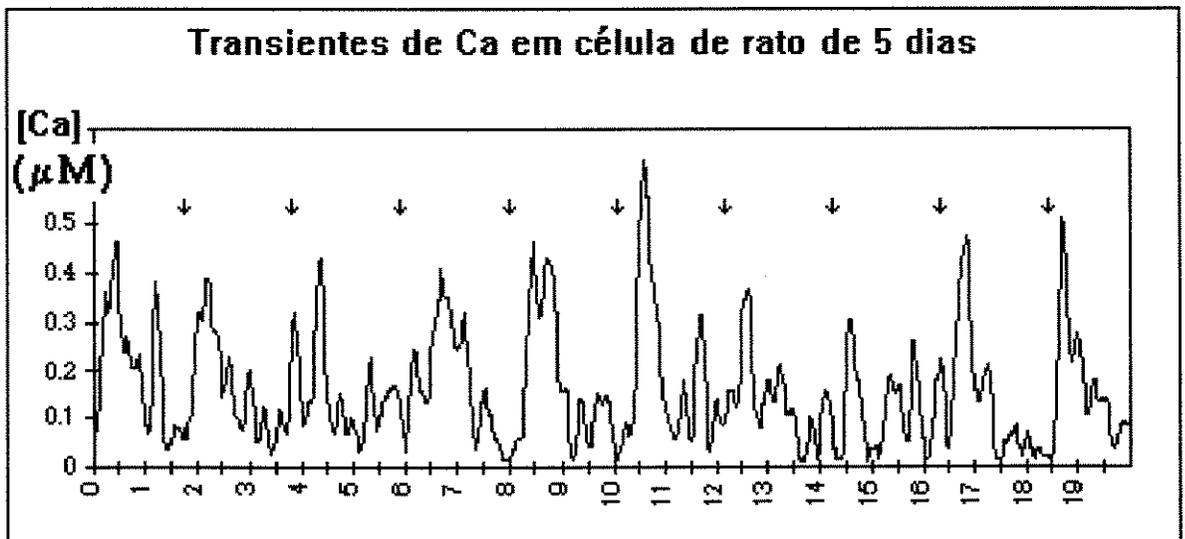


fig. 7.2d - transiente de cálcio em célula de rato de 5 dias. As setas indicam os instantes da aplicação dos estímulos.

A promediação de 5 transientes, utilizando os pulsos de estimulação como referência temporal, foi usada na determinação de $[Ca^{2+}]_{pico}$, $[Ca^{2+}]_{diast}$ e largura a meia altura (fwhm) dos transientes para cada célula. A figura 7.3 ilustra o resultado da promediação dos 5 primeiros transientes das figuras 7.2a e d.

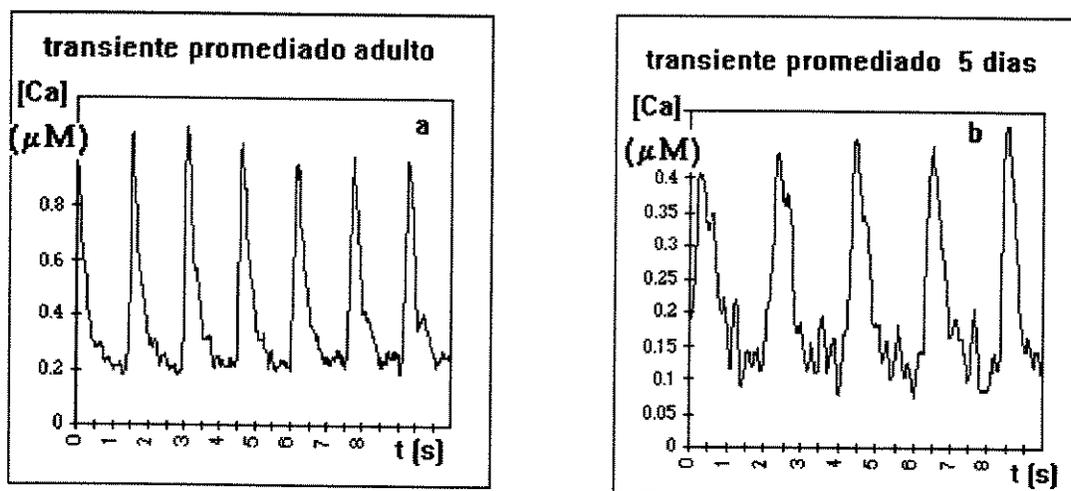


fig 7.3 - transientes obtidos a partir dos dados da fig 7.2a e d, após promediação.

A tabela 7.2 resume os resultados obtidos das três características, dos transientes para cada grupo etário.

Tabela 7.2 - características dos transientes de cálcio para células de animais das diversas idades.

| idade (dias) | [Ca] pico (nM) | | [Ca] diast (nM) | | fwhm (ms) | |
|-----------------|----------------|----|-----------------|----|------------|----|
| | média ± EP | N | média ± EP | N | média ± EP | N |
| 5 | 1500±500 | 5 | 310±80 | 5 | 360±50 | 5 |
| 14 | 1500±200 | 5 | 260±90 | 5 | 270±40 | 5 |
| 30 | 1000±130 | 5 | 190±50 | 5 | 330±40 | 5 |
| 180 | 700±130 | 10 | 190±50 | 10 | 420±50 | 10 |

A figura 7.4 apresenta graficamente os mesmos resultados. Embora seja aparente um aumento de $[Ca^{2+}]_{pico}$ e $[Ca^{2+}]_{diast}$ nos animais mais jovens, a análise de variância não detectou diferença significativa dependente da idade em qualquer destas variáveis.

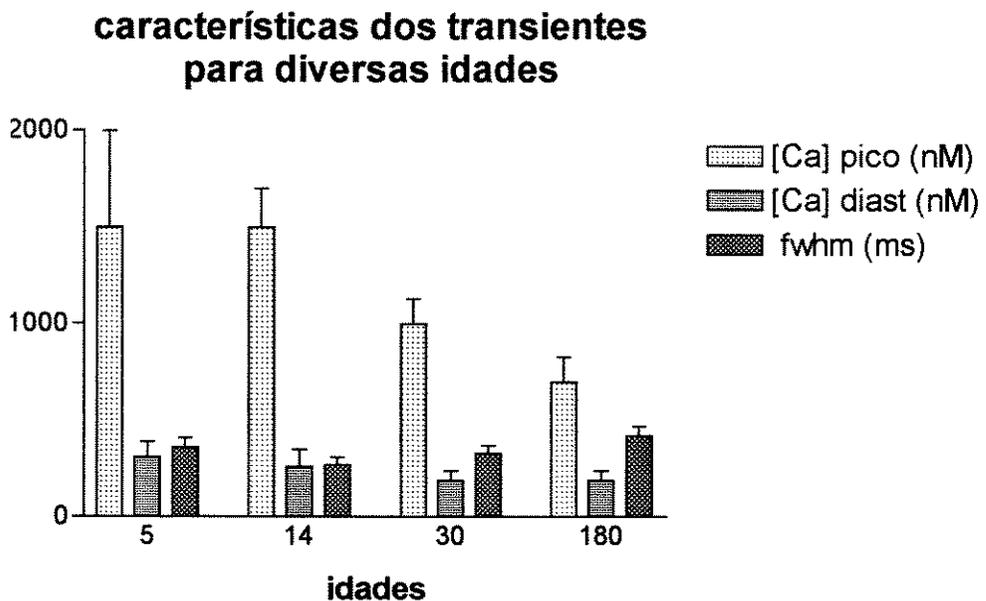


fig 7.4 - características dos transientes de cálcio para células de ratos de diferentes idades.

7.4 - Discussão

Metodologia para a obtenção dos parâmetros de calibração

No presente trabalho o método utilizado para determinação dos parâmetros de calibração foi desenvolvido de modo que o menor número possível de fármacos fosse utilizado. Isto torna o processo de calibração mais confiável e mais fácil de ser executado. O processo clássico da desenergização celular (Bassani et al., 1994a) requer a presença de desacopladores mitocondriais, os quais muitas vezes apresentam fluorescência intrínseca e causam, com o tempo, deterioração estrutural da célula, acarretando perda do indicador. O método desenvolvido permite que os parâmetros de calibração sejam determinados em células individuais após cada experimento.

Este recurso de simplificação do processo de calibração é importante, visto que é arriscado o uso indiscriminado de parâmetros de calibração obtidos com um dado tipo celular. Como já exposto no capítulo 2 e demonstrado neste capítulo, R_{min} , R_{max} e β são afetados por inúmeros fatores e não se mantêm necessariamente num mesmo tipo celular ao longo do desenvolvimento. O presente método, sendo simples, econômico e relativamente rápido, facilita, portanto, a calibração mais confiável dos sinais de fluorescência obtidos.

Outro ponto importante é o uso de K_d apropriado. O emprego de valores obtidos *in vitro*, embora seja uma prática disseminada, pode introduzir erros de magnitude relativamente alta na conversão de R para $[Ca^{2+}]$. Em diversas circunstâncias, foi relatado um aumento de cerca de 3 vezes do K_d do indo-1 e fura-2 no ambiente intracelular ou na presença de proteína miocárdica (Konishi et al., 1988; Hove-Madsen & Bers, 1992; Bassani et al., 1995; Bassani et al., 1998).

Características dos transientes

Há uma grande escassez de dados na literatura quanto à forma e níveis dos transientes de Ca^{2+} em animais de diversas idades (em especial, neonatos). O único trabalho que conseguimos recuperar (Chin *et al.*, 1990) onde transientes em animais neonatos eram mostrados trazia uma célula de coelho de 3 dias, a nosso ver completamente atípica, pois suas dimensões e estrutura são comparáveis a células que obtivemos de ratos de 14 dias ou mais ($60 \times 10 \mu\text{m}$, com estriações bem definidas). Certamente os transientes obtidos com esta célula não podem ser considerados representativos do comportamento da maioria das células dos animais recém nascidos. A escassez citada pode ser compreendida ao levarmos em conta os pontos levantados nos capítulos 6 e 7 deste trabalho: - dificuldade de indução de transientes por meio de estimulação elétrica de campo; - nível de sinal no limite de detecção para células pequenas, e variação dos parâmetros de calibração em diferentes idades. Isto significa que o presente trabalho poderá passar a ser uma referência para aqueles que desejarem estimar as variações de $[\text{Ca}^{2+}]$ em células cardíacas de animais neonatos e jovens.

É surpreendente o fato dos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]$ terem sido aparentemente mais altos em animais neonatos, embora a análise estatística não tenha detectado diferenças significativas. Isto parece ter sido devido à alta variabilidade dos dados na amostra. Mesmo assim, preferimos manter a expectativa da realização de outros tipos de experimentos (e.g., determinando os parâmetros de calibração para células individuais) ou ampliar bastante a amostra antes que possamos chegar a uma conclusão final. No entanto, resultados recentes de nosso laboratório (Bassani *et al.*, 1998) indicam que a capacidade de *buffering* passivo de Ca é cerca de 30% menor no

miocárdio ventricular de ratos neonatos. Isto faria com que um dado fluxo total de Ca^{2+} para o citosol produzisse níveis mais elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (i.e., $[\text{Ca}^{2+}]$ livre) em neonatos do que em adultos.

O nível do sinal apresentado nos exemplos ilustrativos e a qualidade geral do sinal mostrado são, na nossa opinião, perfeitamente satisfatórios. Os traçados apresentados não são os melhores obtidos, mas aqueles que ilustram a média do que normalmente ocorre durante os experimentos.

Como o conjunto de células de animais neonatos inclui células em diversos estágios de diferenciação, não foi fácil, a princípio, identificar claramente quais seriam os miócitos típicos, capazes de produzir atividade contrátil. Curiosamente, os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ não apresentaram características morfológicas muito diferentes daquelas encontradas em células de animais adultos. Os transientes apresentados na figura 7.4 (após promediação) podem certamente ser utilizados para estudo do transporte de Ca^{2+} , que constitui nosso próximo passo a partir do presente trabalho.

Conclusões Finais

Foi feito um estudo aprofundado do fenômeno da fluorescência. Deste estudo pudemos apresentar resultados que auxiliam tanto o engenheiro, no projeto e construção de nova instrumentação, quanto o pesquisador interessado em interpretar seus resultados experimentais de medição de íons por fluorescência.

Um sistema de microscopia de fluorescência completo, foi projetado e construído. O sistema foi utilizado no estudo dos transientes de cálcio em miócitos cardíacos isolados de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (grupos com: 3 - 6; 13 - 16; 28 - 35 e 180 dias de idades).

Apesar dos parâmetros de calibração utilizados na conversão do sinal de fluorescência para valores de $[Ca^{2+}]_i$, não se manterem constantes nos diversos grupos, as características dos transientes não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($[Ca^{2+}]$ diastólico $\sim 180nM$; $[Ca^{2+}]$ pico $\sim 1\mu M$ e $fwhm \sim 0.35ms$).

Estudando o limiar de estimulação elétrica pudemos comprovar experimentalmente que ele diminui com o desenvolvimento do animal, devido à modificação da geometria das células, como previsto pela teoria.

Comentários

Sob nosso ponto de vista acreditamos ter cumprido todos os itens dos objetivos específicos estabelecidos para o presente trabalho. Não consideramos os resultados perfeitos, mas estamos satisfeitos ao apresentar respostas para problemas que estavam há muito tempo sem solução, mesmo em nível internacional. Pudemos também levantar pontos importantes na busca da confiabilidade, precisão e acurácia das medidas, que passavam aparentemente despercebidos mesmo para pesquisadores experientes da área. Grande parte dos assuntos abordados geraram novas idéias e propostas de novos trabalhos para o futuro próximo, como convém a um trabalho de doutorado.

Uma das características fundamentais do trabalho na área de Engenharia Biomédica é a aplicação de conceitos e técnicas das ciências exatas e da Engenharia no tratamento de problemas médicos e biológicos. É altamente desejável que o engenheiro biomédico não seja igual a soma *engenheiro + médico e/ou biólogo*. O trabalho multidisciplinar deve modificar o comportamento anterior do profissional de modo que sua formação básica seja efetivamente base para desenvolvimento de novas idéias, mas sobre um novo substrato vindo da colaboração em grupos multidisciplinares.

Este trabalho foi desenvolvido como tese de doutoramento em Engenharia Elétrica, por um mestre em Física, no Depto. de Engenharia Biomédica (DEB) e Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP. O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular - DEB - CEB, UNICAMP. Neste laboratório as condições para a multidisciplinaridade estão estabelecidas.

Atuam no dia-a-dia do laboratório profissionais vindos da biologia, engenharia elétrica, ciências da computação, física, etc.

Construímos um instrumento para medição da concentração intracelular do íon cálcio em células cardíacas isoladas. Este instrumento permitiu não só a aplicação da teoria estudada e/ou desenvolvida mas também o aprendizado de técnicas da Engenharia e o desenvolvimento de circuitos eletrônicos, partes mecânicas e sistemas ópticos. No final, o resultado obtido ao fazermos os testes típicos de engenharia foi bastante positivo. Contudo não teria sido possível apreciar o que acreditamos ter sido positivo se as células dos animais não tivessem sido colocadas no sistema para teste.

Algumas células poderiam ter sido isoladas no laboratório e a partir de testes cuidadosos concluiríamos que a instrumentação estava funcionando. Fomos um pouco além. A proposta era não apenas usar uma “amostra” biológica para testar o sistema, mas estudar, observar e finalmente poder “lembrar” o que é e como se comporta uma célula do coração. O trabalho envolveu a utilização de células cardíacas de animais neonatos, jovens e adultos. É extremamente curioso ver que as células são inicialmente esféricas, passando posteriormente a um formato mais alongado até atingir, na idade adulta, a forma de um paralelepípedo. É interessante verificar que o eixo maior cresce primeiro, e só após aproximadamente 30 dias o eixo menor começa a crescer significativamente. Esta constatação, ainda que não totalmente formal, a partir da observação de mais de 120 células (descrita no capítulo 6), foi suficiente para despertar nossa atenção sobre muitas das características que eventualmente são pontos chave no entendimento do processo de estimulação elétrica. Questões a respeito do limiar

estimulatório e do efeito das extremidades anguladas da célula sobre este limiar se tornaram tema de trabalho que está sendo desenvolvido por outro aluno como parte de tese de mestrado.

A aplicação dos conceitos de Física Quântica para entendimento do sistema de fluorescência a ser desenvolvido e utilizado, a aplicação da Teoria Eletromagnética para abordar o problema da estimulação por campo, identificado a partir da experimentação fisiológica intensa e a aplicação de todo o conhecimento e experiência acumulados pelos que participaram deste trabalho, na busca de resultados que efetivamente irão permitir avanço no estudo do transporte de cálcio em células cardíacas, nos levam a concluir que o trabalho realizado tenha cumprido os requisitos básicos para um trabalho na área de Engenharia Biomédica.

REFERÊNCIAS

- Angst, B.D., Khan, L.U.R., Severs, N.J., Whitely, K. Rotyhery, S., Thompson, R.P., Magee, A.I. and Gourdie, R.G. Dissociated spatial pattern of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ. Res.*, **80**: 88 - 94, 1997.

- Aidley, D. J. *The Physiology of Excitable Cells*. Cambridge University Press, Cambridge, 1989. 508p.

- Ashley, C.C. & Campbell, A.K. *Detection and Measurement of Free Ca²⁺ in Cells*, Elsevier / North-Holland, Amsterdam, 1979.

- Bassani, R. A., Bassani, J.W. M. & Bers, D. M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol. Lond.*, **453**: 591- 608, 1992.

- Bassani, J.W. M., Bassani, R. A. & Bers, D. M. Twitch-dependent SR Ca accumulation and realease in rabbit ventricular Myocytes. *Am. J. Physiol.*, **265**: C533-C540, 1993a.

- Bassani, J.W. M., Bassani, R. A. & Bers, D. M. Ca²⁺ cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.*, **460**: 603-621, 1993b.

- 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. Lond.*, **476**: 279-293, 1994a.

- Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Calibration of indo-1 and resting intracellular [Ca]_i in intact rabbit cardiac miocytes. *Biophys J*, **68**: 1453-1460, 1995.

- Bassani, J.W. M. & Bassani, R. A. Transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares de rato durante o desenvolvimento pós-natal. Relatório II, FAPESP, 83p. 1997.
- Bassani RA, Bassani JWM & Bers DM. Relaxation in ferret ventricular myocytes: unusual interplay among calcium transport systems. *J Physiol*, **476**: 295-308, 1994b.
- Bassani R.A. & Bers D.M. Na-Ca Exchange is Required for Rest-decay but not for Rest-potenciation of Twitches in Rabbit and Rat Ventricular Myocytes. *Mol Cell Cardiol*, **26**: 1335 - 1347, 1994c.
- Bassani RA, Bers DM. Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum of intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J*, **68**: 2015-2022, 1995.
- Bassani, R.A., Shannon, T.R. & Bers, D.M. Passive Ca binding in neonatal and adult Myocardium. A ser apresentado no *XVI World Congress of the International Society for Heart Research*. Rhodes, Grécia, maio de 1998.
- Beers Y. *Theory of errors*. Reading, Addison-Wesley, 1957. 66p .
- Berlin JR, Bassani JWM, Bers DM. Intrinsic cytosolic calcium buffering properties of single rat cardiac myocytes. *Biophys J*, **67**: 1775-1787, 1994.
- Bers, D. M. & Bridge, J.H.B. Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum Ca-pump: ryanodine and voltage sensitivity. *Circ. Res.*, **65**: 334-342, 1989.
- Bers, D.M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1991.258p.
- Carafoli, E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.*, **71**: 129-153, 1991.

- Campbell, K.P., MacLennan, D.H., Jorgesen, A.O. and Mintzer, M.C. Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 dalton glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **258**: 1197 - 1204, 1983.

- Cheng, H., Lederer, M.R., Xiao, R-P., Gómez, A.M. Zhou, Y-Y., Ziman, B., Spurgeon, H., Lakatta, E.G. and Lederer, W.J. Excitation- contraction coupling in heart: new insights from Ca²⁺ sparks. *Cell Calcium*, **20(2)** : 129 - 140, 1996.

- Chin, TK., Friedman, WF. & Klitzner, TS. Developmental changes in cardiac myocyte calcium regulation. *Circulation Research* , **67**: 574 -579, 1990.

- Crompton, M. The regulation of mitochondrial Ca transport in the heart. *Curr. Top. Membr. Transp.*, **25**: 231-276,1985.

- Fabiato, A. Calcium induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* , **245**: C1-C14, 1983.

- Fawcett, D.W. & McNutt, N.S. The ultrastructure of cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J. Cell. Biol.* **42**: 1 - 45, 1969.

- Grynkiewicz G, Poenie M., Tsien, RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**: 3440-3450, 1985.

- Gómez A.M., Valdivia H.H, Cheng H., Lederer M.R., Santana L.F., Cannel M.B., McCune R.A., Altshuld R.A., Lederer W.J. "Defective Excitation-Contraction Coupling in Experimental Cardiac Hypertrophy and Heart Failure". *Science*, **276**: 800-806, 1997.

- Gunter, TE & Pfeiffer, DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol* , **258**: C755-C786, 1990.

- Hille, B. Na⁺ and K⁺ channels of axons. In: Ionic channels of excitable membranes. Sec. edit., Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Mass, 1992. pp 59-82.

- Hiroshi S, Delbridge LMD, Blatter LA and Bers DM. Surface-volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J*, **70**: 1494-1504, 1996.

- Horowitz, P. & Hill, W. Active filters and oscillators. In: The arts of electronics. New York: Cambridge University Press, 1994. Cap. V, pg 263-306.

- Hove-Madsen L, Bers DM. Indo-1 binding to protein in permeabilized ventricular myocytes alters its spectral and Ca binding protein. *Biophys J*, **63**: 89-97, 1992.

- Huang, M.H., Friend, D.S., Sunday, M.E., Singh, K., Austen, K.F. & Kelly, R.A. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J. Clin. Invest.*, **98**: 1298-1303, (1996).

- Jeltsch, E. & Zimmermann, U. Particles in a homogeneous electrical field: A model for the electric breakdown of living cells in a Coulter counter. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **6**: 349 - 384, 1979.

- Jenkins, F.A. & White, H.E. Fundamentals of Optics. McGraw-Hill Book Co. Singapore 1985. p.746.

- Kao JPY. Practical aspects of measuring [Ca²⁺]_i with fluorescent indicators. In: Nuccitelli R, (Ed.). *Methods in cell biology: a practical guide to the study of calcium in living cells*, vol. 40. San Diego, Academic Press, 1994: pp 155-181.

- Klee, M. & Plonsey, R. Stimulation of Spheroidal Cells - The Role of Cell Shape. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, BME-23,4: 347-354. 1996.

- Konishi M, Olson A, Hollingworth S, Baylor S.M. Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys J*, **54**: 1089-1104, 1988.

- Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Plenum Press, 1991: pp. 3-51.

- Le Blanc, N. & Hume, JR. Sodium current induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science*, **248**: 372-376, 1990.

- Lorrain, P. & Corson, D. Electric Fields X. In: *Electromagnetic Fields and Waves*. New York: W.H. Freeman and Company, 1987. CapXII, 225-237.

- Lotian GF. *Absorption spectrophotometry*. London, Hilger and Watts, 1949. 196 p.

- Mahony, L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart. *Cardiovascular Research*, **31**: E61 - E67, 1996.

- Meissner, G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release Channel of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**: 6300 - 6306, 1986.

- Minamikawa T, Takamatsu T, Kashima S, Fushike S, Fujita S. Confocal calcium imaging with ultraviolet laser-scanning microscopy and indo-1. *Micron*, **24**: 551-556, 1993.

- Minamikawa T, Takahashi A, Fujita S. Differences in features of calcium transients between the nucleus and the cytosol in culture heart cells analysed by confocal microscopy. *Cell Calcium*, **19**: 165-176, 1995.

- Moore EDW, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay FS. Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium*, **11**: 157-179, 1990.

- Morgan KG. Ca^{2+} versus $[Ca^{2+}]_i$. *Biophys J*, **65**: 561-562, 1993.
- Mullins, L.J. Na/Ca Exchange. In: Ion transport in heart. New York: Raven Press, 1981. cap IV, 20-43.
- Nakanishi, T., Seguchi, M. and Takao, A. Development of the myocardial contractile system. *Experientia*, **44**: 936-944, 1988.
- Negretti, N., O'Neill, S.C., & Eisner, D.A. The relative contribution of different intracellular and sarcolemal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.*, **27**: 1826-1830, 1993.
- Niggli E, Piston DW, Kirby MS, Cheng H., Sandison, D.R., Webb, W.W. and Lederer, W.J. A confocal laser scanning microscope designed for indicator with ultra violet excitation wavelengths. *Am J Physiol*, **266**: C303-C310, 1994.
- Ranjan, R. & Thakor, N.V. Electrical Stimulation of Cardiac Myocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, **23**: 812-821, 1995.
- Rendel D. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. New York, John Wiley & Sons, 1987. 419 p.
- Ridgway, E.B., & Ashley, C.C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 229-234, 1967.
- Schild D. Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium*, **19**: 281-296, 1996.
- Sipido KR, Callewaert G. How to measure intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in single cardiac cells with fura-2 or indo-1. *Cardiovasc Res*, **29**: 717-726, 1995.

- Spray, D. C. & Burt, J. M. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am. J. Physiol.* **258**: C195-C205, 1990.

- Spurgeon, H.A., Stern, M.D., Baartz, G., Raffaelli, S., Hansford, R.G., Talo, A., Lakatta, E.G. and Capogrossi, M.C. Simultaneous measurements of Ca^{2+} , contraction, and potential in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **258** : H574 - H586 , 1990.

- Tsien RY. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**: 527-528, 1981.

- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*, **94**: 325-334, 1982.

- Tsien RY, Rink TJ, Poenie M. Measurement of cytosolic Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, **6**: 145-157, 1985.

- Tung, L. Slitz, N. Mulligan, M. R. Influence of Electrical Axis of Stimulation on Excitation of Cardiac Muscle Cells. *Circulation Research*, **69**: 772-730, 1991

- Varro, A., Negretti, N., Hester, S.B. & Einer, D.A. An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch*, **423**: 158-160, 1993.

- Wahl, M., Lucherini MJ, Gruenstein E. Intracellular Ca^{2+} measurements with indo-1 in substrate-attached cells: advantages and special considerations. *Cell Calcium*, **11**: 487-500, 1990.

- Westerblad H, Allen DG. Intracellular calibration of the calcium indicator indo-1 in isolated fibers of *Xenopus* muscle. *Biophys J*, **71**: 908-917, 1996.

- Zot, A.S. & Potter, J.D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**: 535-559,1987.