UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DA DIREÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO SOBRE O LIMIAR DE ESTIMULAÇÃO DE MIÓCITOS VENTRICULARES ISOLADOS

KATHERINE ALMEIDA LIMA

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Alberto Paes Gomes

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por KATHERINE ALMEIDA LIMA e aprovada pela Comissão Julgada em 29/04/1999

Orientador

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Prof. Dr. José Antenor Pomilio

Prof. Dr. Antônio-Carlos Guimarães de Almeida

Curso: Engenharia Elétrica
Área de concentração: Automação

Dissertação de mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Campinas, abril de 1999
SP – Brasil

UNICAMP
CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
V. Ex.
TOMBO BC/38687
PROC. 229/99
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 04/09/99
N.º CPD

CM-00134264-7

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

L628e

Lima, Katherine Almeida
Efeito da direção do campo elétrico sobre o limiar de estimulação de miócitos ventriculares isolados. / Katherine Almeida Lima.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Paulo Alberto Paes Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Estímulos elétricos. 2. Células musculares. 3. Miocárdio. 4. Campos elétricos. 5. Modelos matemáticos. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Gomes, Paulo Alberto Paes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos [...] e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e não tivesse amor, nada seria"

1 *Coríntios* 13:1-2

Dedico este trabalho à minha mãe, Odilene,

a pessoa que mais amo, admiro e respeito.

AGRADECIMENTOS

Nada se faz sozinho nem para si mesmo, por isso gostaria de humildemente agradecer todos aqueles que contribuíram e trabalharam comigo para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Agradeço:

Ao prof. José W.M. Bassani, pela orientação, paciência, compreensão e apoio que foram fundamentais na elaboração deste trabalho.

Ao prof. Paulo Gomes, pela co-orientação e pelas preciosas idéias e sugestões.

A prof. Rosana A. Bassani, pela imprescindível colaboração, sem a qual o trabalho não se realizaria.

Ao prof. Frederico Montenegro, pela amizade e indispensável ajuda e paciência sempre presente no decorrer desta jornada.

Aos prof. Sergio Muhler, prof. Saide Calil e, especialmente, ao prof. Eduardo Costa pelos ensinamentos durante os cursos. Ao prof. Carlos Marcelo Gurjão Godoy, pelos projetos e pelas importantes dicas.

Ao meu pai, por todo carinho, pensamento positivo e apoio mesmo a distância.

Aos meus irmãos e grandes amigos, Késia e Kleiber, com quem sempre contei.

A Tia Socorro pelo enorme carinho. A Adeilde, Salaberga (vovó Belega), vovó Nita, Jenelice (Mami), Tio Odilon, Tia Beta e Tio Oscar, Tia Neta, Valdete e Venilton, Cleber, Sonya Clara e meus familares, pela enorme torcida..

A Fábio César, pelo incentivo, amizade e apoio. A Geice pela doçura, amizade e companheirismo em todos os momentos deste trabalho. A Sandro, pela amizade, coleguismo e criatividade. A João Carlos, pelas preciosas conversas. A Jose Puglisi (Pepe), pela alegria e conselhos.

A Samira, Eliene, Mharta, Aninha, Vaneska, Fernanda, Cristina, Helene, minhas companheiras de república, pela a inestimável paciência, incentivo e compreensão.

Aos amigos e colegas: Débora, Elisabetta, Denilson, Rafaella, Joaquim, Ricardo, Eliane, Marden, Ernesto, Zeev, Eduardo Tinois, Wagner, Vera Button, Leopoldo, Josemar, Beatriz, Christianne e Nivaldo.

A D. Lourdes, por ter cuidado de mim e a Wlademir.

As secretárias Nirlei, Eloísa e Noêmia Benatti, pela eficiência e compreensão.

Aos técnicos: Gilson, Fabiana, Rubia, Eugênio, Mauro, Noêmia, Márcia (Marcinha), Rogério Toledo, Claudinei, Vanderlei, Osvaldo Bottcher, Luis Gustavo e, em especial, a Alexandre Tedeschi, pela grande ajuda. A Valdinéia (Val), Erica Carvalho, Marisa, Silvia, Sérgio Moura, D. Iracema, Cássia, Ângela, Adilson, Marcio Watonick, Gastão e Márcio Savi.

RESUMO

A estimulação de células cardíacas por meio da aplicação de um campo elétrico **E** é relevante devido a sua importância na desfibrilação e em estudos fisiológicos. Neste trabalho, foi construído um sistema para geração de **E** uniforme (12 sentidos, de 0° a 360°) numa câmara de estimulação de miócitos cardíacos isolados de ratos. Em cada direção de estimulação, determinou-se E_L (menor **E** capaz de produzir uma contração). Baseado num modelo eletromagnético (Klee M. e Plonsey R., *IEEE Trans Biomed Eng*; **BME-23**: 347-354, 1976), calculou-se a despolarização local máxima da membrana, V_L, quando E_L foi alcançado. Observou-se uma influência significativa de θ (ângulo entre **E** e o eixo maior da célula) sobre E_L e V_L, sendo estes mínimos para θ=0° (limiar longitudinal, $E_L^{//}$=2,28 ± 0,07 V/cm; $V_L^{//}$=13,97 ± 0,37 mV; N=35) e máximos para θ=90° (limiar transversal, $E_L^{\perp}$=5,06 ± 0,26 V/cm; $V_L^{\perp}$= 16,75 ± 0,83 mV; N=17). Não houve influência significativa da polaridade sobre E_L ou V_L. Para uma ampla faixa de duração do pulso (2 a 20ms), $E_L^{\perp}$ foi maior que $E_L^{//}$ ($E_L^{\perp} \cong 2\ E_L^{//}$; P<0,001; N=5). Para a duração de 5ms, os limiares obtidos com pulsos bipolares ($E_L^{\perp}$=5,55 ± 0,31 V/cm e $E_L^{//}$= 2,73 ± 0,25 V/cm) foram menores (P<0,001; N=6) que os obtidos com pulsos monopolares ($E_L^{\perp}$= 7,36 ± 0,38 V/cm e $E_L^{//}$=3,62 ± 0,28 V/cm). Para uma ampla variação de θ e para diferentes duração e forma do pulso, houve uma boa concordância entre teoria e experimentação indicando que o modelo pode contribuir para o entendimento do comportamento de miócitos isolados submetidos a **E**. Se, no tecido cardíaco, as propriedades testadas nas células isoladas forem mantidas, dois pulsos bipolares aplicados ortogonalmente podem aumentar a eficácia da desfibrilação.

ABSTRACT

Studying electrical field **E** stimulation of cardiac cells is relevant because of its application to defibrillation as well as in physiology. We developed an stimulation setup aiming at studying **E** stimulation (12 directions, from 0° to 360°) of isolated rat cardiac myocytes. For each direction, E_L, the lowest **E** to trigger a cell contraction, was determined. The maximum local membrane depolarization (V_L) at E_L was calculated based on an electromagnetic model (Klee M. and Plonsey R., *IEEE Trans Biomed Eng*; **BME-23**: 347-354, 1976). E_L and V_L were significantly dependent on the angle (θ) between E and the cell major axis. E_L and V_L were the greatest at θ=90°, (transversal threshold, $E_L^{\perp}$=5,06 ± 0,26 V/cm; $V_L^{\perp}$= 16,75 ± 0,83 mV; N=17) and the lowest at θ=0° (longitudinal threshold, $E_L^{//}$=2,28 ± 0,07 V/cm; $V_L^{//}$=13,97 ± 0,37 mV; N=35). Stimulus polarity did not affect E_L or V_L. No matter the stimulus duration (from 2 to 20ms), $E_L^{\perp}$ was greater than $E_L^{//}$ ($E_L^{\perp}$ about twice $E_L^{/}$; P<0,001; N=5). At 5ms duration, biphasic stimulation yielded lower (P<0,001) threshold values ($E_L^{\perp}$ =5,55 ± 0,31 V/cm and $E_L^{//}$ = 2,73 ± 0,25 V/cm; N=6) as compared to monophasic pulses ($E_L^{\perp}$=7,36 ± 0,38 V/cm and $E_L^{//}$= 3,62 ± 0,28 V/cm; N=6). For a wide range of θ and for different stimulus duration/waveform, we found a good agreement between the theory and the experimental data which suggests that the model may be helpful in understanding field stimulation in heart. We speculate that if our results can be extrapolated (at least in part) to the whole heart, the use of orthogonal field stimulation may improve cardiac defibrillation efficacy.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS 8

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS 9

3.2 – CÉLULAS 9

3.3 – SOLUÇÃO 10

3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

3.4.1 - CÂMARA DE ESTIMULAÇÃO 10

3.4.2 – ELETRODOS 13

3.4.3 – ESTIMULADOR ELÉTRICO 14

3.4.4 – OSCILOSCÓPIO 14

3.5 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 – MAPEAMENTO DO CAMPO ELÉTRICO 15

3.5.2 – MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO FISIOLÓGICA 16

3.5.3 –EXPERIMENTOS COM CÉLULAS 19

3.6 – PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS 25

CAPÍTULO 4 – BASES TEÓRICAS

4.1 – DETERMINAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE ESTIMULAÇÃO 26

4.2.- ÁREA DE TRABALHO ESTABELECIDA A PARTIR DAS BASES TEÓRICAS 34

CAPÍTULO 5 – MODELOS PARA ESTIMULAÇÃO POR CAMPO

5.1 – MODELO BIOLÓGICO 37

5.2 – MODELO ELETROMAGNÉTICO 39

CAPÍTULO 6 – RESULTADOS

6.1 – MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO FISIOLÓGICA 43

6.2 - MAPEAMENTO DO CAMPO ELÉTRICO 45

6.3 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS 49

CAPÍTULO 7 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES 59

APÊNDICE I 68

APÊNDICE II 74

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Desenho do PA ventricular e suas fases.

Figura 1.2 – Desenho esquemático do sistema de condução do coração.

Figura 1.3 – Relação temporal entre a contração muscular e as alterações do potencial transmembrana

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 – Peça cilíndrica da câmara de estimulação.

Figura 3.2 – Câmara para medição de potenciais elétricos.

Figura 3.3 – Câmara para estimulação de células cardíacas.

Figura 3.4 – Montagem experimental para medição do potencial ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação e ao longo do eixo transversal ao eletrodos.

Figura 3.5 – Montagem experimental para medição da condutividade da solução.

Figura 3.6 – Esquema geral da instrumentação usada nos experimentos.

Figura 3.7 – Pulsos estimulatórios.

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 – Disposição do par de fios infinitos no espaço xyz.

Figura 4.2 – Linhas de campo em torno de dois fios com altura h imersos num meio condutor.

Figura 4.3 – Seção transversal central limitada pela casca cilíndrica e pelas superfícies dielétricas.

Figura 4.4 – Módulo do campo elétrico no interior da câmara de estimulação em 3D.

Figura 4.5 – Ângulo do campo elétrico no interior da câmara de estimulação em 3D.

Figura 4.6 – Desvio relativo do campo no eixo transversal aos eletrodos de estimulação.

Figura 4.7 – Desvio relativo do campo no eixo que une os eletrodos de estimulação.

CAPÍTULO 5

Figura 5.1- Modelo Biológico

Figura 5.2 – Representação da célula no modelo proposto por Klee e Plonsey (1976).

CAPÍTULO 6

Figura 6.1 – Condutividade da solução de KCl.

Figura 6.2 – Potencial elétrico ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação

Figura 6.3 – Campo elétrico ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação.

Figura 6.4 – Potencial elétrico ao longo do eixo transversal ao eixo que une os eletrodos de estimulação.

Figura 6.5 – Gráfico polar de E_L e V_L em função de θ, para uma célula típica.

Figura 6.6 – Gráfico polar da média de $E_L \pm$ EPM e $V_L \pm$ EPM em função de θ.

Figura 6.7 – $V_L \pm$ EPM e $E_L \pm$ EPM em função de θ.

Figura 6.8 - Razão entre campo limiar transversal e longitudinal.

Figura 6.9 – Curva Intensidade *versus* duração nas direções longitudinal e transversal.

Figura 6.10 – Limiar estimulatório I (mA) ± EPM e $E_L \pm$ EPM obtidos com pulsos monopolares e bipolares na polaridade 1e 2.

APÊNDICE I

Figura A1.1 – Fio infinito no vácuo envolvido por uma superfície gaussiana Σ .

Figura A1.2 – Posicionamento dos dois fios infinitos e representação do campo elétrico.

Figura A1.3 – Representação dos fios infinitos no plano xy.

Figura A1.4 –Representação das distâncias dos diferenciais de carga ao ponto P.

APÊNDICE II

Figura A2.1 – Desenho esquemático das linhas de campo de **E** em r=b.

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 – Dados experimentais de E_L e V_L em função de θ para a célula típica

Tabela 6.2 – Média ± EPM de E_L e V_L em função de θ .

Tabela 6.3 – Média ± EPM do limiar estimulatório obtido nas direções longitudinal e transversal em ambas as polaridades, com pulsos monopolares e bipolares.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O coração é um órgão muscular oco composto por quatro câmaras: dois átrios (direito e esquerdo) e dois ventrículos (direito e esquerdo). A comunicação entre os átrios e ventrículos é feita por meio das válvulas átrio-ventriculares, que abrem e fecham devido ao gradiente de pressão. A função do coração é bombear o sangue para todo corpo através dos vasos sangüíneos. A eficiência da ação bombeadora do coração requer uma atividade rítmica e coordenada dos átrios e ventrículos que segue um padrão seqüencial de excitação e contração.

A célula cardíaca (miócito cardíaco) é capaz de responder a um estímulo com uma variação do potencial de membrana, V_m (diferença de potencial - ddp) entre os meios interno e externo da célula). Quando em repouso, este potencial é de aproximadamente –85 mV, negativo dentro em relação ao meio externo. Se a ddp é reduzida a partir do repouso, dizemos que a célula é despolarizada. A despolarização pode induzir o aparecimento de um potencial de ação (PA), que consiste em uma variação brusca e característica de V_m na direção de potenciais positivos , não mais controlável pelo estímulo aplicado.

A atividade contrátil do coração é disparada a partir da ocorrência do PA. As diversas regiões do coração apresentam potenciais de ação com formas e cursos temporais diferentes.

Em nossos experimentos foram usadas células ventriculares cujo PA pode ser dividido em cinco fases (figura 1.1). A fase 0 é caracterizada por uma despolarização inicial rápida (V_m ~ +20 mV). Ocorre em seguida a fase 1, onde há uma queda rápida de V_m (repolarização parcial). A fase 2 é marcada por um platô (V_m ~ 0 mV) que persiste por 200 ms. O PA fica progressivamente mais negativo (repolarização) na fase 3, chegando aos níveis de repouso. A fase 4 (fase diastólica) é o intervalo entre o final da repolarização e o início do próximo PA.

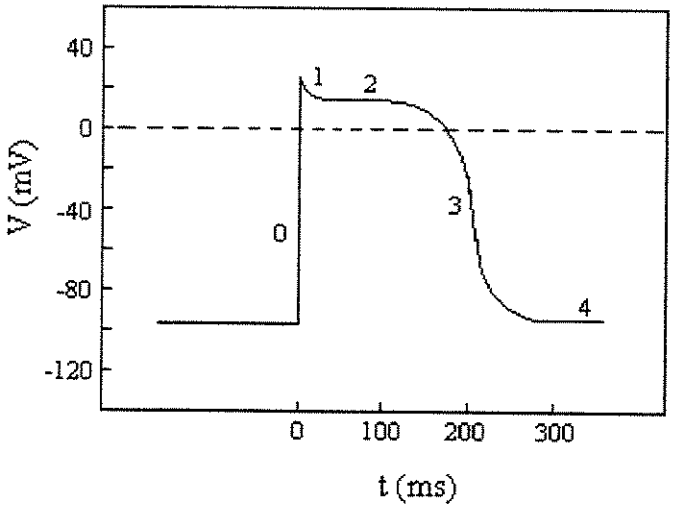


Figura 1.1 - Desenho do PA ventricular e suas fases. Modificado de Berne e Levy (1991).

O PA se propaga por toda célula cardíaca por meio de acoplamento espacial de corrente elétrica. Embora independentes, as células cardíacas são interligadas intimamente por meio de estruturas juncionais sofisticadas (discos intercalados) onde em geral encontram-se conexões de baixa resistência (*gap-juntions*). Através dessas estruturas, a atividade elétrica é transmitida de uma célula para outra, propagando-se rapidamente por todo o coração.

A atividade elétrica cardíaca origina-se no nódulo sino-atrial (S-A), onde se encontram as células marcapasso que são capazes de gerar espontanemente um PA (figura 1.2) . O PA percorre com velocidade típica de 1 m/s, inicialmente os átrios, até atingir o nódulo átrio-ventricular (A-V), onde sofre uma redução na velocidade de condução e consequentemente um atraso da ordem de 75 ms. Deste modo, os átrios se contraem antes dos ventrículos, permitindo enchimento adicional destes últimos. Em seguida, o PA propaga-se rapidamente (velocidade de 1,5 m/s) para os ventrículos através do sistema especializado de condução de His-Purkinje. Nos ventrículos, o estímulo espraia-se (velocidade de 1m/s) para todas as células, disparando a atividade contrátil ventricular.

O conjunto de eventos desde a ativação elétrica das células até o desencadeamento da atividade contrátil é denominado acoplamento excitação-contração. Observe na figura 1.3 que a atividade elétrica precede a atividade contrátil.

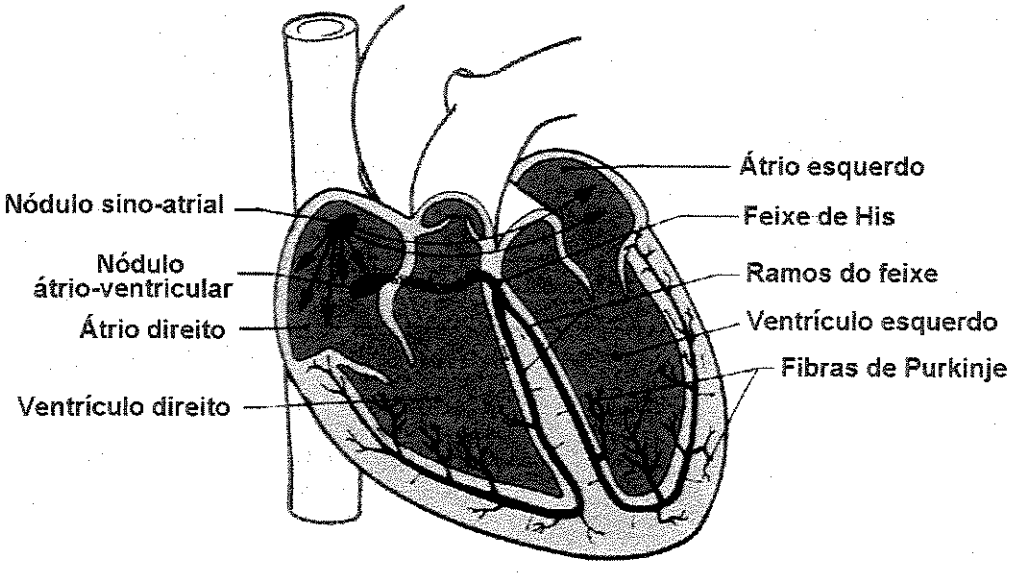


Figura 1.2 – Desenho esquemático do sistema de condução do coração. Modificado de Berne e Levy (1991)

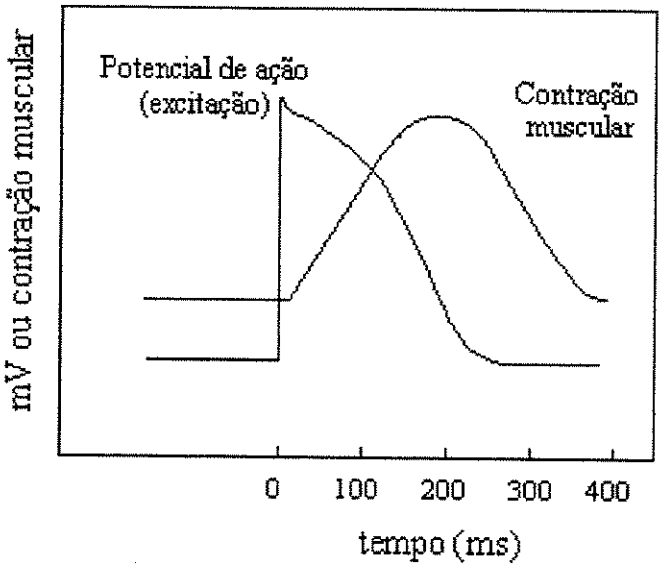


Figura 1.3 – Relação temporal entre a contração muscular e as alterações do potencial transmembrana. Modificado de Berne e Levy (1991).

O músculo cardíaco é uma estrutura anisotrópica na qual a resposta a um estímulo elétrico depende da direção em que este é aplicado. Dentre outros fatores, a anisotropia da fibra cardíaca causa diferenças na velocidade de condução e na resistividade do tecido cardíaco (Roberts et al.,1979), na duração do potencial de ação (Osaka et al.,1987), no limiar de excitação (Frazier et al., 1988), no prolongamento da repolarização por estimulação elétrica (Knisley et al., 1993; Ranjan e Thakor, 1995) e na iniciação de fibrilação (Knisley et al., 1992).

Cada célula do coração é independentemente excitável e capaz de ter seu aparato contrátil acionado. Deste modo, um dos caminhos para se avançar no entendimento da resposta do coração a estímulos elétricos é estudar o comportamento da célula cardíaca isolada quando submetida a um campo elétrico (Bardou et al, 1990; Tung et al, 1991; Ranjan e Thakor, 1995; Gomes, 1997).

A estimulação elétrica é frequentemente utilizada em laboratório para ativar tecidos excitáveis (como é o caso do tecido cardíaco) na ausência de um estímulo fisiológico. As células cardíacas podem ser estimuladas *via* injeção de corrente ou *via* a aplicação de um campo elétrico externo. No primeiro caso, a corrente é injetada na célula através da membrana por meio de um micro-eletrodo. Na estimulação por campo (EC) não há introdução de corrente na célula mas esta gera sua própria corrente de despolarização

Uma vantagem da EC é ser um procedimento não invasivo, podendo gerar uma contração celular de modo não lesivo à membrana e possibilitar que o estudo seja feito da maneira mais fisiológica possível.

Com base na literatura (Klee e Plonsey, 1976; Krassowska et al., 1987; Tung e Borderies., 1992; Knisley et al., 1993; Krassowska e Neu, 1994; Ranjan e Thakor, 1995), a membrana pode ser considerada um dielétrico. Neste caso, a estimulação por campo, ou seja, a aplicação de um campo elétrico externo **E** produz, primeiramente, um fluxo de corrente em torno da célula que resultará num gradiente de potencial ao longo da superfície externa da célula. Considerando que o potencial intracelular seja aproximadamente constante, o potencial transmembrana V_m varia espacialmente de acordo com o potencial externo, a partir do repouso. Quando V_m alcança valores que permitam a abertura de canais iônicos tensão-dependentes (inicialmente canais de Na^+) presentes na membrana celular, um PA é disparado, possibilitando o início do processo de acoplamento excitação-contração celular. Neste ponto, o campo limiar E_L, campo capaz de produzir uma contração, é atingido. Assume-se em um dos modelos clássicos (Klee e Plonsey, 1976) que V_m dependa da amplitude do campo aplicado $\boldsymbol{E}$, do ângulo θ formado entre $\boldsymbol{E}$ e o eixo maior da célula (direção do campo aplicado) e da geometria da célula. A membrana é polarizada positivamente ($V_m > 0$) no lado do anodo (-) e

negativamente ($V_m < 0$) no lado do catodo (+), como demonstrado teorica (Klee e Plonsey, 1976) e experimentalmente (Knisley et al., 1993). Este modelo eletromagnético também prevê que V_m induzido por um campo externo é maior quando este campo é aplicado ao longo do eixo maior da célula.

A resposta de uma célula cardíaca à aplicação de um campo elétrico tem recebido atenção na literatura devido à sua relevância tanto sob o ponto de vista clínico quanto para entendimento dos aspectos fisiológicos. Clinicamente, EC é extremamente importante nos processos de desfibrilação e cardioversão, nos quais um grande "choque" externo é aplicado ao músculo cardíaco numa tentativa de extinguir arritmias prolongadas que podem vir a ser fatais (e.g. fibrilação e taquiarritmias). A eficiência do choque está intimamente ligada à energia requerida para desfibrilar (ERD). Alguns trabalhos recentes (Bardou et al., 1988; Jones et al., 1988) mostram que há uma redução na ERD quando pulsos desfibrilatórios são aplicados sequencialmente e em direções ortogonais. Neste caso, o primeiro pulso ativa uma subpopulação de células alinhadas com o campo, e o segundo, as células alinhadas com o campo ortogonal ao primeiro, levando à ativação de um maior número de células. Este procedimento aumenta as chances de sucesso na desfibrilação cardíaca e permite a redução do campo em cada direção, minimizando danos no coração e pulmões c causados pela aplicação de campos muito elevados. Além disto, a redução na ERD pode reduzir o tamanho de cardioversores-desfibriladores implantáveis e o tempo de vida destes pode ser prolongado.

Recentemente, em experimentos realizados em células cardíacas isoladas, foi observado que E_L, menor campo capaz de produzir uma contração, é cerca de duas vezes e meia maior na direção transversal que na direção longitudinal da célula (Ranjan e Thakor, 1995). Bardou et al. (1990) mediram limiar de estimulação de miócitos isolados para θ

variando de 0° a 90° (com incrementos de 10°) e observaram que o limiar aumentava exponencialmente com θ.

Em nosso laboratório, foi abordado o problema de estimular adequadamente células isoladas de animais de diversas idades (Gomes, 1997). Foi observado que a célula cardíaca muda tanto de tamanho quanto em forma durante o desenvolvimento pós-natal. Devido a limitações experimentais, os autores não puderam medir o limiar nas direções transversal e longitudinal para a mesma célula mas, viram claramente que, independente da idade, o limiar longitudinal (θ=0°) e sempre menor que o transversal (θ=90°). Neste estudo, com células de ratos adultos, foi obtida uma razão de 0,4 ± 0,1 entre o campo longitudinal e o transversal.

No presente trabalho ampliamos os estudos do efeito da direção do campo elétrico sobre E_L em miócitos ventriculares de ratos adultos, com relação ao apresentado pelos autores supracitados. Projetamos e construímos um sistema para geração de campo elétrico uniforme no interior de uma câmara de estimulação de miócitos ventriculares que nos possibilitou verificar E_L para **E** aplicado em 12 sentidos percorrendo toda a circunferência. Além disto, utilizando o modelo eletromagnético proposto por Klee e Plonsey (1976), fomos capazes de, pela primeira vez em miócitos cardíacos, calcular a despolarização local da membrana em função da corrente aplicada para geração de campo.

No trabalho desenvolvido, além do suporte teórico do modelo eletromagnético, foram realizados experimentos com células cardíacas isoladas que confirmaram algumas predições do modelo.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

- Projetar e construir um sistema para geração de campo elétrico uniforme em várias direções numa câmara de estimulação de miócitos ventriculares isolados;

- Estudar o efeito da direção do campo elétrico sobre o limiar de estimulação em miócitos ventriculares de ratos adultos;

- Calcular, com base no modelo teórico desenvolvido por Klee e Plonsey (1976), a despolarização local da membrana (V_L) quando o campo limiar estimulatório é alcançado.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS

Foram utilizados miócitos ventriculares isolados de ratos Wistar adultos de ambos os sexos, provenientes do biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB), UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas recebendo água e ração à vontade e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os animais não receberam qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

3.2 - CÉLULAS

As células cardíacas foram obtidas por digestão enzimática do tecido cardíaco ventriular dos animais, conforme descrito por Bassani et al, 1992.

3.3 - SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

A solução fisiológica em nossos experimentos foi a solução de Tyrode (140 mM NaCl; 6 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 5 mM HEPES (N-2 Hydroxyethilpiperazine – N"-2 Ethanesulfonic acid); 11mM glicose; 1mM $CaCl_2$; pH 7,4 a 23°)

3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

3.4.1 - **CÂMARA DE ESTIMULAÇÃO** (Fabr. Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP)

Foi projetada e construída uma câmara de estimulação cilíndrica em acrílico transparente. A câmara é composta por duas partes: peça cilíndrica e base. As partes são presas através de parafusos, formando um pequeno reservatório.

A peça cilíndrica tem altura de 5 mm e raio de 20mm. Esta peça possui bordas salientes com 12 orifícios espaçados de 30° que permitem a passagem dos eletrodos de estimulação (eletrodos de platina), como ilustra a figura 3.1. Esta peça é comum a todos os experimentos realizados.

A base encaixa-se no fundo da peça cilíndrica. Há dois tipos de base cuja utilização varia de acordo com o experimento a ser realizado. O primeiro tipo, ilustrado na figura 3.2, é usado na medição de potencial elétrico no interior da câmara.

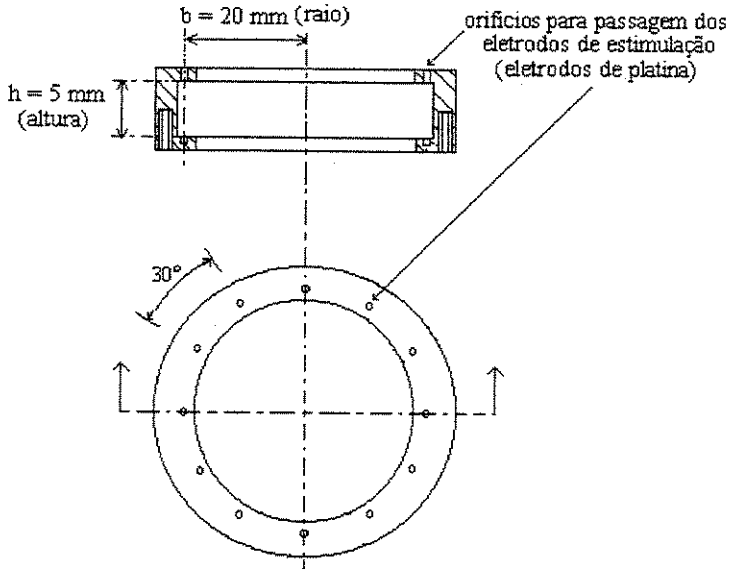


Figura 3.1 – Peça cilíndrica da câmara de estimulação.

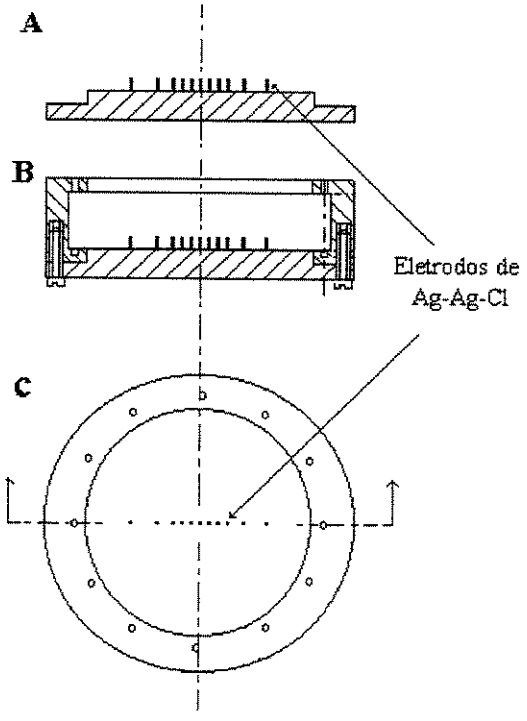


Figura 3.2 – A) Base com eletrodos de Ag-AgCl, B) Conjunto base + peça formando a câmara para medição de potenciais elétricos, C) Vista superior desta câmara.

A figura 3.2A ilustra a base com 11 eletrodos de Ag-AgCl, estando um dos eletrodos exatamente no centro. A figura 3.2B ilustra esta base acoplada à peça cilíndrica formando a câmara para medição de potencial elétrico cujo procedimento experimental será descrito na seção 3.5. A vista superior do conjunto é ilustrada na figura 3.2C.

O outro tipo de base (figura 3.3) é usada em experimentos com células. O conjunto base mais peça cilíndrica forma a câmara de estimulação de células cardíacas. As células são depositadas no fundo da câmara que, por sua vez, é acoplada ao estágio de um microscópio.

Essa base possui um orifício central que permite a passagem de luz do microscópio. O orifício foi coberto por uma lamínula que foi colada no fundo da câmara, como mostrado na figura 3.3.C.

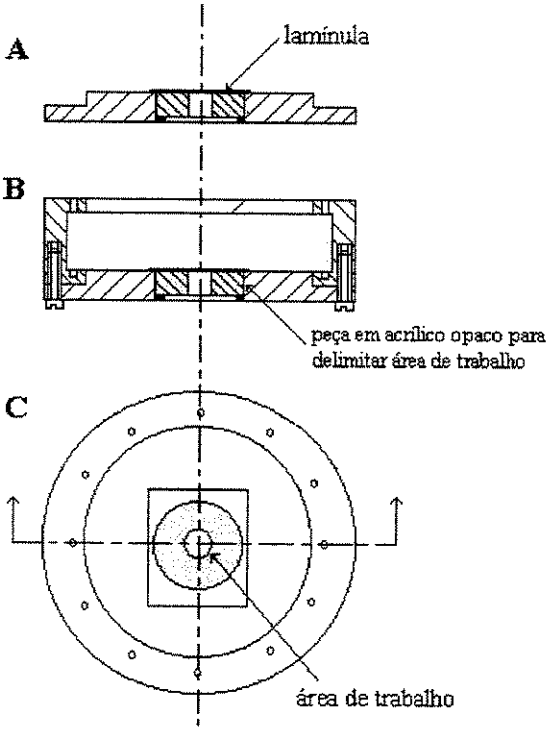


Figura 3.3 – A) Base para experimentos com células, B) Conjunto base + peça formando a câmara para estimulação de células cardíacas, C) Vista superior desta câmara, destacando a área de trabalho.

Por baixo da lamínula (figura 3.3A), foi acoplada uma peça em acrílico opaco que possui um orifício central (figura 3.3B). O diâmetro deste orifício foi determinado por meio de cálculos (vide capítulo 4, seção 4.1) e delimita a área de trabalho. Deste modo, as únicas células observadas ao microscópio encontram-se nesta área, como ilustra a figura 3.3C.

Experimentos preliminares mostraram que seria necessário um campo elétrico com maior intensidade para estimular as células na direção transversal aos seus eixos maiores. Com base nos cálculos (capítulo 4), dimensionamos uma nova câmara com as mesmas características (cilíndrica e h= 5 mm) porém com b = 10 mm (metade do raio da original). Deste modo, duplicamos o campo elétrico no interior da câmara de estimulação.

3.4.2 – ELETRODOS

Foram utilizados dois tipos de eletrodos: eletrodos de platina (eletrodos de estimulação) e eletrodos de Ag-AgCl (eletrodos de captação).

Foram utilizados 12 eletrodos de platina (5 mm de comprimento), posicionados na borda da câmara de estimulação.

Os 11 eletrodos de Ag-AgCl (vide figura3.2) foram obtidos pela imersão de eletrodos de prata num banho de hipoclorito de sódio (água sanitária), durante 2 minutos, simultaneamente à passagem de corrente elétrica (cloretação dos eletrodos). Para medição de potencial elétrico, os eletrodos (2,5 mm de comprimento) foram alinhados ao longo do diâmetro da base (figura 3.2C).

3.4.3 – **ESTIMULADOR ELÉTRICO** (Fabr. Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP).

Este estimulador (projetado pelo prof. Dr. Carlos Marcelo G. de Godoy) fornece pulsos retangulares de tensão mono e bipolares, com amplitude de 0 a 40 V, duração de 0,5 a 30 ms e frequência de 0,125 a 33,3 Hz. Este estimulador foi alimentado por uma fonte de tensão simétrica de 40V e 15V (Fabr. Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP).

Em nosso trabalho, a grandeza que realmente nos interessa é a corrente que flui através dos eletrodos de platina imersos na solução que contém as células, pois a partir desta corrente determinamos o campo elétrico no interior da câmara (equação 4.16). Esta corrente foi monitorada a partir da queda de tensão em um resistor de precisão de 10, 048Ω em série com a carga (volume condutor contendo a solução fisiológica e células). A amplitude desta corrente varia, aproximadamente, de 0 a 100mA. Durante o trabalho, para facilitar, mencionaremos que foram aplicados pulsos de corrente em vez de pulsos de tensão.

3.4.4 – **OSCILOSCÓPIO** (Fabr. Tektronix Inc. , Beaverton, Oregon, U.S.A. – mod. Tektronix 2230, com memória)

Este instrumento foi utilizado para medição dos pulsos de tensão fornecidos pelo estimulador e também monitorar queda de tensão no resistor de precisão.

3. 5 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 – MAPEAMENTO DO CAMPO ELÉTRICO

Em nosso trabalho, precisamos conhecer o campo elétrico no interior da câmara. Para isso, medimos experimentalmente o potencial elétrico ϕ e determinamos um ajuste (baseado na equação 4.15, capítulo 4) que descreve o comportamento de ϕ. A partir do ajuste de ϕ, determinamos o campo elétrico ($\vec{E} = -\nabla\phi$), deste modo mapeamos experimentalmente o campo interior da câmara. Em seguida fizemos a comparação (capítulo 6, seção 6.1) entre os resultados teórico (descritos no capítulo 4) e experimental.

No decorrer do trabalho, o campo referido como campo medido é aquele que foi obtido por meio do gradiente de ϕ.

Experimentos para medição de potencial foram realizados a partir da montagem ilustrada na figura 3.4. Como descrito anteriormente (figura 3.2), a câmara para medição de potencial é composta pela peça cilíndrica e pela base com 11 eletrodos de captação (eletrodo de Ag-AgCl).

A câmara foi preenchida com a solução de Tyrode e, através dos eletrodos de platina, foram aplicados pulsos de corrente (16 mA, 0,5 Hz e 5 ms). Com a chave na posição 1, medimos o potencial ao longo do eixo transversal aos eletrodos de estimulação (eixo x) e na posição 2, ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação (eixo y). A tensão em cada um dos 11 eletrodos de captação (eletrodo exploratório) foi medida e a diferença entre o eletrodo exploratório e o eletrodo central (referência) foi efetuada. Cada eletrodo foi escolhido por meio da chave B (figura 3.4). Estas medições foram realizadas seis vezes em cada eixo.

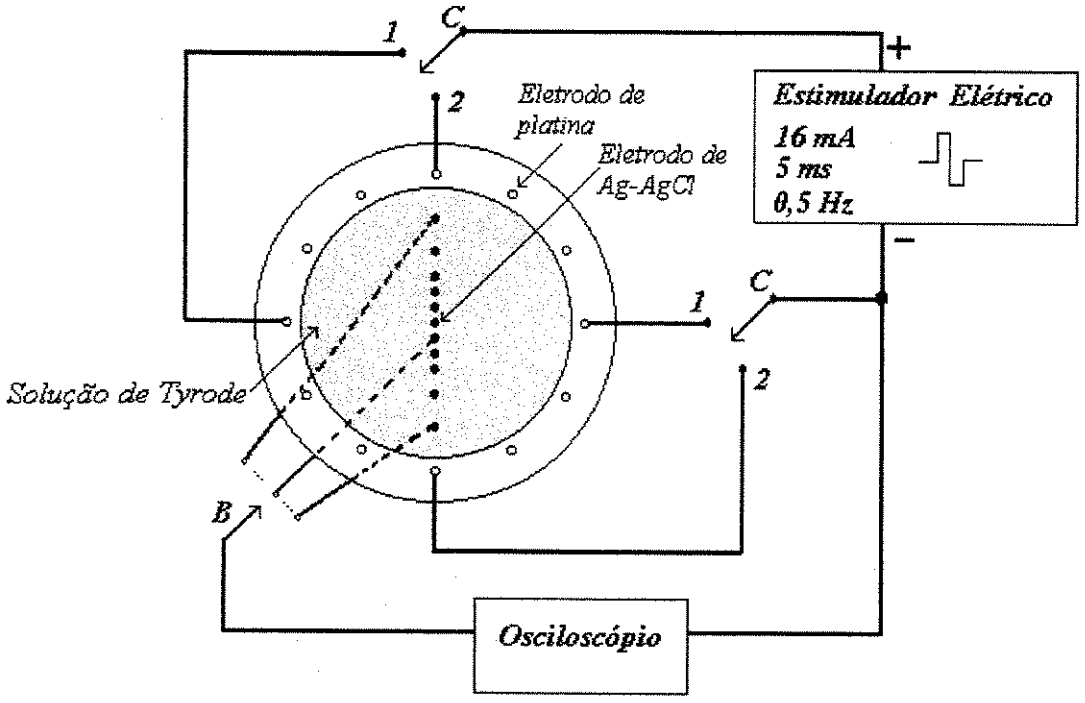


Figura 3.4 – Montagem experimental para medição do potencial ao longo dos eixos *x* (chave C em 1) e *y* (chave C em 2). Ao longo do diâmetro, a base da câmara possui 11 eletrodos de captação (um deles localizado no centro), que são selecionados por meio da chave B.

3.5.2 – MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

É necessário para a determinação teórica do campo e do potencial elétrico no interior da câmara (capítulo 4) sabermos o valor da condutividade da solução de Tyrode. Com esta finalidade, realizamos a montagem experimental mostrada na figura 3.5.

Em um tubo de PVC, fizemos dois orifícios distantes 70 cm onde posicionamos os eletrodos de captação (Ag-AgCl) envolvidos por um tubo fino de vidro (detalhe da figura 3.5, à direita). Preenchemos o tubo de PVC com a solução e fechamos ambas as extremidades com rolhas de borracha onde estavam acoplados eletrodos de estimulação (detalhe da figura 3.5, à esquerda).

Através dos eletrodos de estimulação, aplicamos à solução pulsos de tensão (15 V, 2s) disparados manualmente. No osciloscópio, captamos a tensões V_1 ,V_2 (tensões nos eletrodos de captação) e V_R (tensão na resistência R) medidas em relação ao terra. Como se trata de um circuito em série, a corrente que atravessa o resistor R, I_R, é a mesma corrente que atravessa a solução, I_S (equação 3.1).

$$I_R = I_S = \frac{V_R}{R} \qquad \text{eq. 3.1}$$

A partir de I_s e de V_1 e V_2, obtivemos a resistência da solução, R_s (equação 3.2).

$$R_S = \frac{V_2 - V_1}{I_S} \qquad \text{eq. 3.2}$$

Para um campo elétrico uniforme **E**, a equação 3.3 descreve a resistência de um corpo condutor de comprimento ℓ e área da seção transversal uniforme A que transporta uma corrente cuja densidade **J** é uniforme em todos os planos normais ao fluxo (Paris e Hurd, 1984).

$$R = \frac{\oint \vec{E} \bullet d\vec{\ell}}{\int \vec{J} \bullet \hat{n} dA} = \frac{\ell}{\sigma A} \qquad \text{eq. 3.3}$$

onde $\sigma = \frac{\vec{J}}{\vec{E}}$ é a condutividade do corpo condutor.

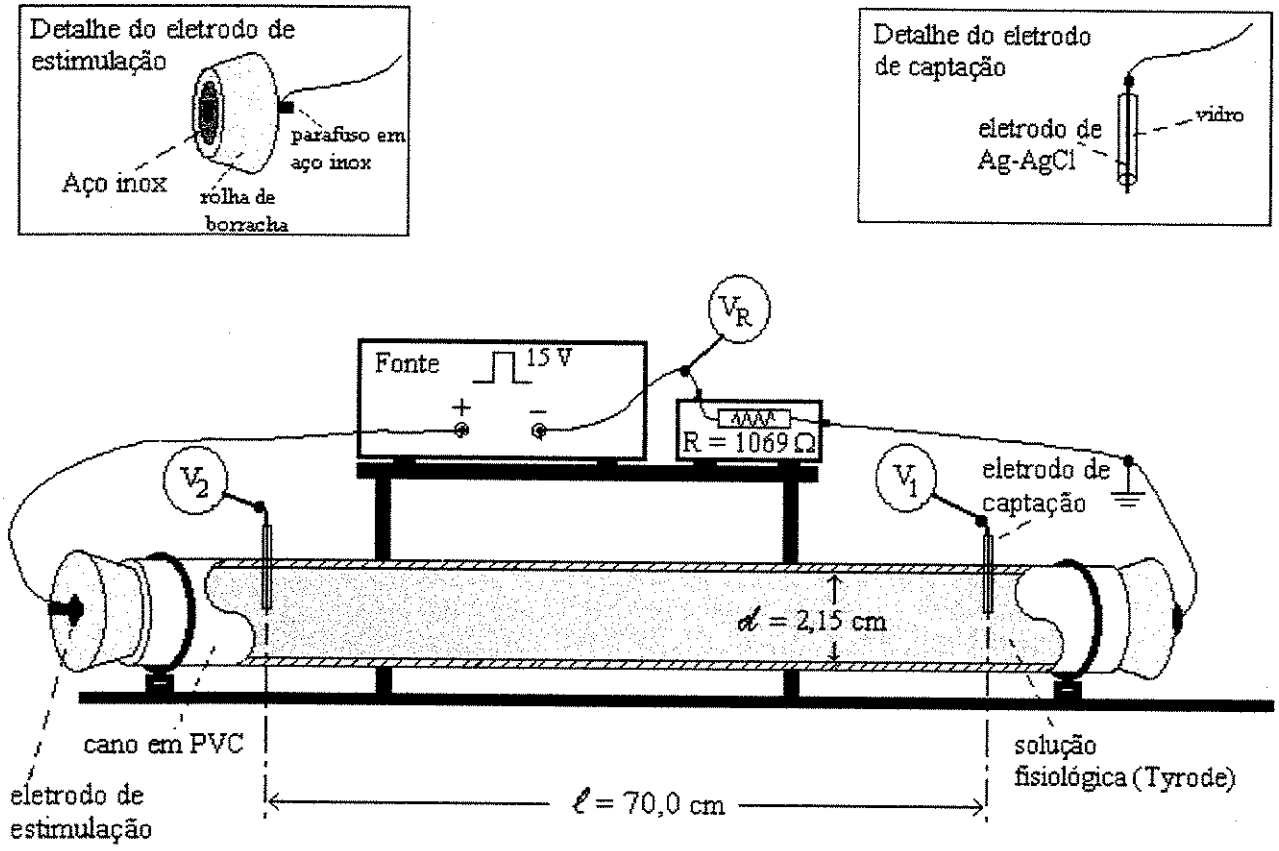


Figura 3.5 – Montagem experimental para medição da condutividade da solução. Para melhor ilustrar o interior do tubo de PVC, foi feito um corte longitudinal onde podemos observar os eletrodos de captação

Como o campo elétrico e a corrente não variam espacialmente em cada seção reta do interior do tubo, podemos aplicar a equação 3.3 ao nosso problema. Então determinamos experimentalmente a condutividade da solução, σ_{exp}, por meio da equação 3.4.

$$\sigma_{exp} = \frac{1}{R_S}\frac{\ell}{A} \qquad \text{eq. 3.4}$$

Para testarmos o sistema, medimos experimentalmente a condutividade da solução de KCl em várias concentrações. Calculamos o valor da condutividade para cada concentração e comparamos o valor obtido experimentalmente com o valor teórico.

O cálculo da condutividade de uma solução de sal monovalente (KCl), $\sigma_{KCl}(teo)$, foi feito por meio da equação 3.5 (Benedek e Villars, 1979).

$$\sigma_{KCl}(teo) = \frac{nN_0e^2}{kT}(D_+ + D_-) \qquad \text{eq. 3.5}$$

onde n é a concentração do sal (moles/litro), N_0 é o número de Avogadro, e é a carga do elétron (Coulomb) , k é a constante de Boltzman (Joule/ mol litro), T é a temperatura (graus Kelvin) e D_+ e D_- são os coeficientes de difusão de K^+ e Cl^- (m^2/s), respectivamente.

3.5.3 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

Inicialmente, uma fina camada de colágeno foi aplicada ao fundo da câmara de estimulação para melhorar a adesão das células. Após 20 minutos, as células isoladas foram depositadas na câmara e um novo período de 20 minutos foi aguardado para que as células ficassem aderidas à lamínula (figura 3.3A), evitando movimento que poderia atrapalhar a medição. Por fim, a câmara foi preenchida com um volume conhecido (6 ml e 1,57 ml para câmara com b=20 mm e b=10 mm, respectivamente) de solução de Tyrode.

A instrumentação utilizada nos experimentos com células é ilustrada na figura 3.6. A câmara de estimulação (CE), contendo células isoladas (Cel) e solução fisiológica, foi

colocada no estágio de um microscópio equipado com uma tela plana (TM). A imagem das células foi projetada em TM com aumento de 250 vezes para observação das contrações, medição do ângulo de aplicação do campo elétrico (θ) e das dimensões celulares (a e c). Cada par de eletrodos foi selecionado por meio da chave seletora (CS), definindo a direção de estimulação (0 a 5). Pulsos bipolares de corrente (0-100mA, 0,5 Hz e 5 ms - duração total 10 ms) foram aplicados utilizando-se o estimulador elétrico (Est) e a fonte (F). O conjunto câmara de estimulação, chave seletora, estimulador e fonte compõem o sistema para geração de campo elétrico uniforme.

O estímulo foi monitorado no osciloscópio (O), onde foi medido o limiar de estimulação, ou seja, a mínima corrente capaz de induzir uma contração. A partir da corrente, obtivemos o campo limiar E_L (equação 4.16). Realizamos a medição do limiar com CS (figura 3.6) numa determinada direção de estimulação e em seguida, mantendo CS na mesma direção,

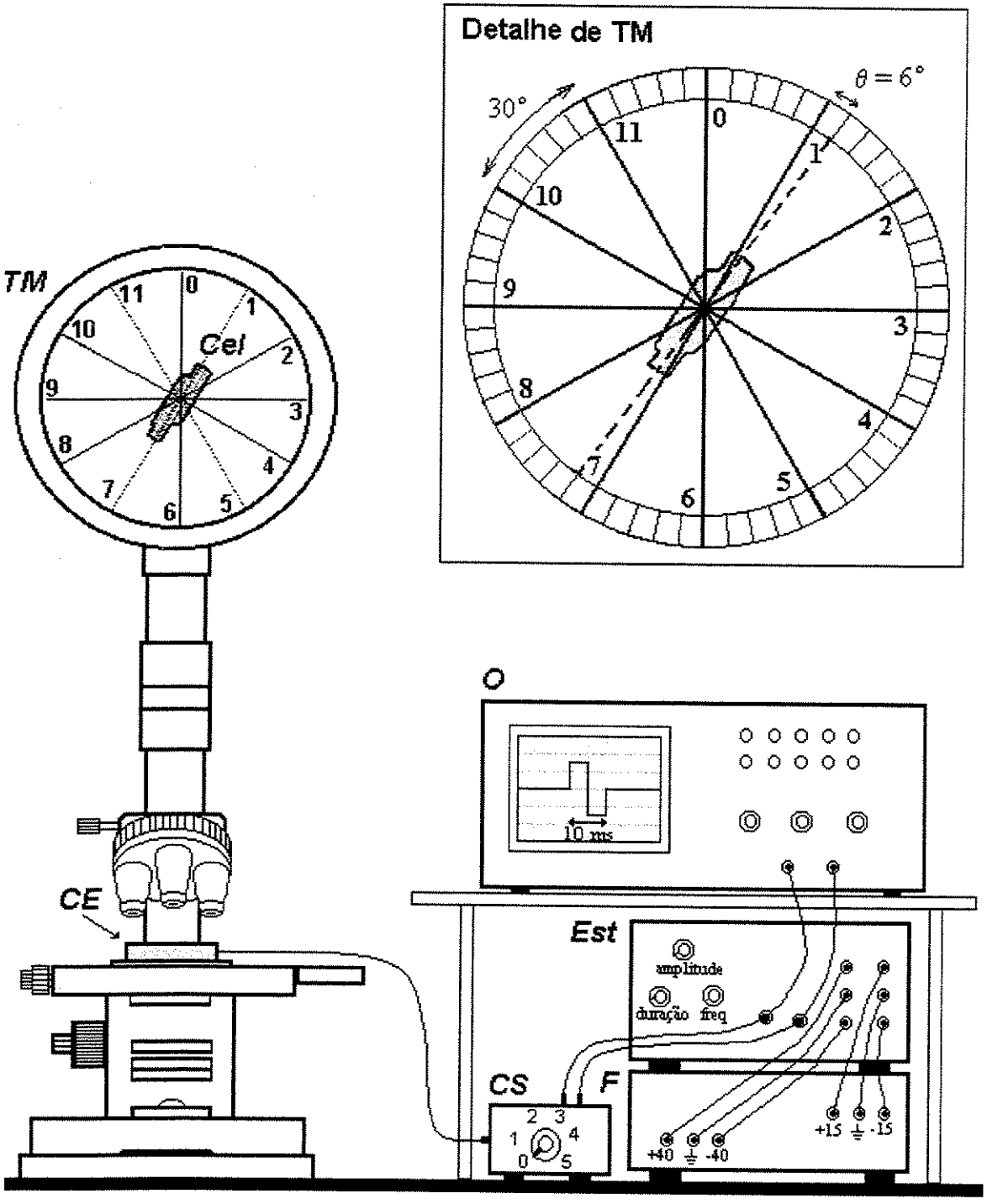


Figura 3.6 – Esquema geral do aparato para medição do limiar de estimulação, do ângulo θ e das dimensões celulares. Para descrição do esquema, vide texto (pág. 19). O detalhe da tela plana do microscópio (TM) ilustra θ para a célula da figura (Cel).

invertemos os fios de entrada de CS. Deste modo, invertemos o sentido do pulso, ou seja, mudamos a polaridade. Este procedimento foi efetuado em cada direção de estimulação, totalizando 12 medições de limiar por célula, percorrendo a circunferência .

A forma da célula foi obtida por meio de cópia, por transparência, da imagem projetada em TM (detalhe de TM, figura 3.6). Além da forma, em nosso experimento também é necessário medirmos as dimensões celulares, ou seja, semi-eixos menor e maior da célula, a e c, respectivamente. Para isso, inserimos no estágio do microscópio uma gratícula (com resolução de 10 μm) que foi projetada na TM. A partir desta projeção foi construída uma régua para medição das dimensões celulares.

Em nossos experimentos, também é necessário sabermos o valor de θ, menor ângulo entre a direção de estimulação e o eixo maior da célula. A figura 3.6 ilustra um exemplo típico onde o eixo maior (*c*) da célula (Cel) encontra-se entre as direções 1 e 2. Neste caso, *c* está mais próximo da direção 1 (direção preferencial). Por meio da cópia (por transparência) da imagem da célula (detalhe da figura 3.6, canto superior direito) definimos $\theta = 6°$, em relação à direção preferencial. Consequentemente, para cada direção seguinte, acrescenta-se 30° ao valor encontrado na direção preferencial. A precisão para definição do ângulo é de 3°. Observe que θ que pode variar no intervalo de –15° a +15° em relação a cada direção.

Para uma melhor caracterização da preparação biológica, realizamos curvas de Intensidade *versus* duração (curva Ixd) para campos aplicados nas direções longitudinal e transversal da célula. Em uma mesma célula, foram aplicados pulsos bipolares de corrente (0-100mA, 0,5 Hz) com duração variável (2, 5, 10 e 20 ms) e, para cada duração, foram medidos os limiares de estimulação nas direções longitudinal e transversal. Para cada direção, cada duração com seu respectivo limiar formam um ponto na curva Ixd de uma célula.

Como esperado para tecidos excitáveis (Lapicque, 1926; Fozzard e Schoenberg, 1972; Pearce et al., 1982; Geddes e Bourland, 1985; Tung et al., 1991), os dados de uma curva Ixd seguem aproximadamente uma relação hiperbólica e podem ser ajustados por uma curva empírica tipo Weiss-Lapicque (Geddes e Bourland, 1985) ou por uma curva teórica, chamada de Lapicque-Hill (Plonsey e Fleming, 1969; Fozzard e Schoenberg, 1972; Pearce et al., 1982).

A curva de Weiss-Lapicque é dada pela equação 3.6:

$$I = I_{rh}\left(1 + \frac{c_r}{d}\right) \qquad \text{eq. 3.6}$$

onde I_{rh} é a reobase, ou seja, corrente estimulatória para pulsos com duração infinita (assíntota da corrente) e c_r é a cronaxia, definida por Lapicque (1926) como a duração para duas vezes I_{rh}. A cronaxia é diferente para cada tipo de tecido, sendo longa para tecidos com baixa velocidade de propagação (músculo liso) e curta para tecidos com alta velocidade de propagação (nervos motores).

A partir do momento que a membrana de uma célula excitável foi representada por uma resistência R em paralelo com um capacitância C, tornou-se possível derivar analiticamente uma expressão para curva ixd (curva de Lapicque-Hill) onde a corrente requerida para estimular tecidos excitáveis é dada pela equação 3.7.

$$I = \frac{I_{rh}}{1 - e^{-d/\tau}} \qquad \text{eq. 3.7}$$

onde τ é a constante de tempo da membrana ($\tau = RC$).

A curva empírica e analítica são semelhantes (Geddes e Bourland, 1985). Nossos dados (figura 6.9) ajustaram-se melhor à expressão empírica de Weiss-Lapique (equação 3.6).

Nos experimentos com células descritos até o momento, foram usados pulsos bipolares de corrente (figura 6.10 B) que diminuem a ocorrência de polarização dos eletrodos de estimulação. A polarização causa mudança nas características elétricas dos eletrodos e contaminação da preparação biológica, podendo até matar as células.

Em nosso trabalho, também verificamos que a medição do limiar estimulatório com pulsos bipolares poderia mascarar o efeito da mudança de polaridade, já que aqueles possuem, inerentemente, dois pulsos com polaridades invertidas. Visando eliminar dúvidas sobre este aspecto, realizamos medições de limiar nas direções transversal e longitudinal usando pulsos monopolares (figura 3.7 A) e bipolares (figura 3.7 B), invertendo a polaridade em cada direção. Cada medição for realizada três vezes, em cada célula.

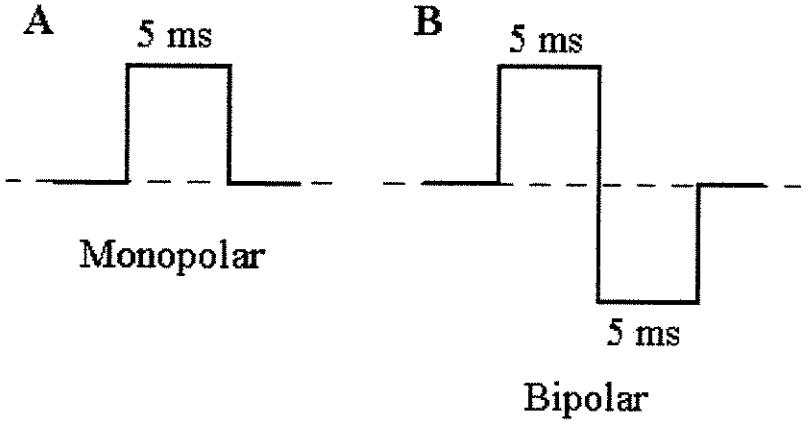


Figura 3.7 – Pulsos estimulatórios: A) Monopolar com duração de 5 ms e B) Bipolar, onde cada pulso possui duração de 5 ms.

3.6 – PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para avaliarmos os efeitos de θ (ângulo entre o campo elétrico e o eixo maior da célula) e da polaridade sobre E_L efetuamos análise de variância bifatorial .

A avaliação do efeito de θ sobre a despolarização local máxima da membrana, V_L, aplicamos análise de variância monofatorial. Para analisar o efeito de θ e da polaridade sobre V_L, usamos análise de variância bifatorial.

Para analisarmos o efeito da direção do pulso (transversal ou longitudinal) sobre a cronaxia e a reobase, efetuamos análise de variância monofatorial.

Realizamos análise de variância bifatorial para verificarmos o efeito da polaridade e forma do pulso (mono ou bipolar) sobre E_L e o mesmo tipo de análise para avaliarmos o efeito da direção do pulso (longitudinal ou transversal) e da forma do pulso sobre o limiar.

Os cálculos foram realizados utilizando uma planilha no MICROSOFT EXCEL 5.0 (Microsoft Corporation, 1995) elaborada por Sandro A. Ferraz (Departamento de Engenharia Biomédica ,Unicamp, Campinas , SP).

Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados como um indicativo de significância estatística.

CAPÍTULO 4

BASES TEÓRICAS

4. 1 - DETERMINAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE ESTIMULAÇÃO

Em nosso trabalho é essencial conhecermos o campo elétrico **E** ao qual a célula é submetida quando estimulada. Neste capítulo, calcularemos o vetor **E** no interior da câmara de estimulação cilíndrica de raio b e altura h preenchida por um volume condutor (solução Tyrode).

Para efetuarmos o cálculos do campo elétrico no interior da câmara, passaremos por algumas etapas. Começaremos determinando o campo elétrico em torno de dois fios infinitos localizados no vácuo. Posteriormente, calcularemos o campo em torno dos fios imersos num volume condutor. Seguiremos a resolução fazendo com que os fios tenham uma altura finita *h* e , por fim, limitaremos o campo a uma região cilíndrica com raio b. Assim, descreveremos o campo no interior da câmara de estimulação.

A equação 4.1 descreve $\mathbf{E}_1$, campo elétrico em torno de um par de fios infinitos, paralelos, com densidade linear de carga $+\rho$ e $-\rho$ e separados por uma distância 2b no vácuo

(permissividade ε_0) (figura 4.1). Observe que o campo elétrico independe de z. O desenvolvimento do cálculo de $\mathbf{E}_1$ encontra-se no Apêndice I .

$$\bar{E}_1(x,y) = \frac{\rho b}{\pi\varepsilon_0}\left\{\frac{1}{[x^2+(y+b)^2][x^2+(y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x + (x^2-y^2+b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq. 4.1}$$

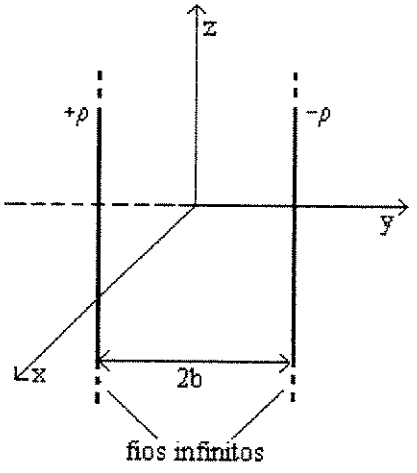


Figura 4.1 – Disposição do par de fios infinitos no espaço xyz. Os fios estão no plano yz

Na eletrostática, quando colocamos uma carga pontual q na origem de um sistema de coordenadas, no vácuo, geramos um campo e um potencial elétricos dados (em coordenadas esféricas) pelas equações 4.2 e 4.3, respectivamente.

$$\bar{E}(r) = \frac{q}{4\pi\varepsilon_0 r^2}\hat{a}_r = -\nabla\phi(r) \qquad \text{eq. 4.2}$$

$$\phi(r) = \frac{q}{4\pi\varepsilon_0 r} \qquad \text{eq. 4.3}$$

De acordo com a Teoria do Volume Condutor , ao colocarmos uma fonte de corrente pontual i na origem de um sistema de coordenadas de um meio condutor (condutividade σ) infinito, essa corrente fluirá neste volume condutor indefinidamente. A densidade de corrente **j** pode ser expressa pela equação 4.4 e o campo elétrico associado a esta densidade é dado pela relação de Ohm, descrita pela equação 4.5.

$$\vec{j}(r) = \frac{i}{4\pi r^2}\hat{a}_r \qquad \text{eq. 4.4}$$

$$\vec{E}(r) = \frac{\vec{j}(r)}{\sigma} = \frac{i}{4\pi\sigma r^2}\hat{a}_r \qquad \text{eq. 4.5}$$

Observando as equações 4.5 e 4.2, podemos concluir que o campo gerado por uma carga pontual no vácuo é igual ao campo gerado por uma fonte de corrente pontual em um meio condutor (volume condutor), se fizermos a substituição indicada abaixo:

$$\frac{q}{\varepsilon_0} \rightarrow \frac{i}{\sigma} \qquad \text{eq. 4.7}$$

A partir das equações 4.1 e 4.7, podemos obter o campo elétrico $\mathbf{E_2}$ (equação 4.8) em torno de dois fios infinitos imersos em um volume condutor com condutividade σ e densidade linear de corrente λ.

$$\vec{E}_2(x,y) = \frac{\lambda b}{\pi\sigma}\left\{\frac{1}{[x^2+(y+b)^2][x^2+(y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x + (x^2-y^2+b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq.4.8}$$

Adicionamos aos cálculos interfaces de materiais dielétricos nos planos z=0 e z=h, delimitando os limites superior e inferior da câmara. Como observado na equação 4.8, não há componente de campo na direção de z, ou seja, o campo é tangente às interfaces dielétricas obedecendo às condições de contorno na fronteira condutor-dielétrico. Então o campo na região entre os planos não é afetado pela presença dos dielétricos e pode ser descrito pela equação 4.9. A figura 4.2A ilustra as linhas de campo de $\mathbf{E_3}$.

$$\bar{E}_3(x,y)=\frac{b}{\pi\sigma}\left(\frac{I_3}{h}\right)\left\{\frac{1}{[x^2+(y+b)^2][x^2+(y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x+(x^2-y^2+b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq.4.9}$$

onde I_3 é a corrente que atravessa o volume condutor limitado por superfícies dielétricas em z=0 e z=h.

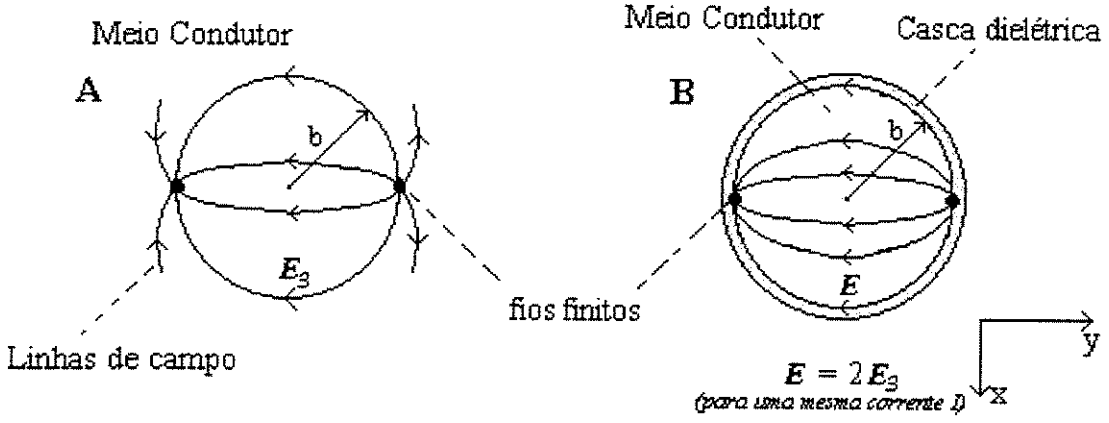


Figura 4.2 – A) Vista superior das linhas de campo E_3 em torno de dois fios com altura h distantes de 2b imersos num meio condutor; B) Vista superior das linhas de campo em torno de dois fios imersos num meio condutor e envoltos por uma casca cilíndrica dielétrica de raio b e altura h.

Por fim, incluímos em nossos cálculos o posicionamento de uma casca cilíndrica dielétrica com raio b que envolve os fios, como mostra a figura 4.2B. A presença desta casca poderia afetar o campo na região interna alterando, em cada ponto, a direção e/ou o módulo do campo. Primeiramente, por meio de cálculos (vide Apêndice II), encontramos que em r=b só existe campo tangencial à casca dielétrica, ou seja, **E** normal à superfície é nulo. Então a condição de contorno na fronteira dielétrico-condutor foi novamente obedecida e, consequentemente, a direção do campo não foi afetada pela casca dielétrica.

Restringir a corrente somente à região interna do cilindro evidentemente altera a intensidade do campo nesta região, fazendo com que para a mesma corrente I_3 tenhamos um campo maior. Calculamos, então o fluxo de corrente I (fluxo que atravessa uma seção transversal limitada pela casca e pelos planos) em função do fluxo de corrente I_3 (fluxo que atravessa uma seção transversal limitada apenas pelos planos) (vide figura 4.3). A densidade de corrente (**J**) e o campo que atravessa esta seção são descritos pelas equações 4.10 e 4.11 (caso particular da equação 4.9), respectivamente.

$$\bar{J} = \sigma \bar{E}_3(x, y = 0) \qquad \text{eq. 4.10}$$

$$\bar{E}_3(x, y = 0) = \frac{I_3 b}{\pi h \sigma}\left(\frac{1}{x^2 + b^2}\right)\hat{a}_y \qquad \text{eq. 4.11}$$

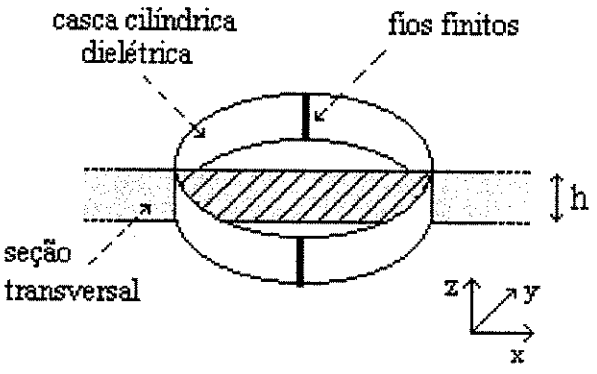


Figura 4.3 – Seção transversal central (x,y=0,z) limitada pelas interfaces e pela casca dielétrica (área hachurada) e limitada apenas pelas interfaces dielétricas em z=0 e z=h (área cinza). Os fios finitos estão envoltos pela casca e imersos no volume condutor limitado pelas superfícies dielétricas em z=0 e z=h

A corrente I_3 pode ser descrita pela equação 4.12. A relação entre I e I_3, descrita pela equação 4.13, foi obtida pelas devidas substituições das equações 4.10 e 4.11 na primeira igualdade da equação 4.13 que descreve I.

$$I_3 = \int_{-\infty}^{\infty} \bar{J} \bullet \hat{n} dS \qquad \text{eq. 4.12}$$

$$I = \int_{-b}^{b} \bar{J} \bullet \hat{n} dS = \frac{I_3}{2} \qquad \text{eq. 4.13}$$

onde S é a área da seção transversal, **n** é a normal à seção transversal.

A partir de 4.13, concluímos que é necessária a metade da corrente da situação sem a casca, I_3, para se produzir o mesmo campo na situação com a casca. A melhor forma de

interpretar esse resultado é a seguinte: para uma mesma corrente I, o campo **E** gerado no interior da casca é o dobro de $\mathbf{E}_3$ (situação sem a casca) (figura 4.2).

Assim, **E** e ϕ no interior da câmara de estimulação são dados pelas equações 4.14 e 4.15, respectivamente.

$$\bar{E}(x,y) = \frac{2Ib}{\pi\sigma h}\left\{\frac{1}{[x^2+(y+b)^2][x^2+(y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x + (x^2-y^2+b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq. 4.14}$$

$$\phi(x,y) = -\frac{I}{\pi\sigma h}\ln\sqrt{\frac{x^2+(y+b)^2}{x^2+(y-b)^2}} \qquad \text{eq. 4.15}$$

Nas condições de nossos experimentos, o campo varia com o tempo mas os efeitos que dependem da variação temporal do campo **E**(r,t) são desprezíveis em relação àqueles causados diretamente pelo valor do campo (considerando a polarização instantânea da membrana). Deste modo, podemos aplicar a aproximação quasi-estática (onde a derivada de qualquer função em relação ao tempo é nula) a **E**(r,t) que pode a ser descrito pela equação 4.14

A figura 4.4 ilustra o módulo do campo elétrico normalizado pelo campo no centro da câmara de estimulação. Observamos que há uma grande variação do módulo do campo ao longo do eixo que une os eletrodos (eixo y) enquanto que ao longo do eixo transversal aos eletrodos (eixo x) esta variação é mais suave. O ângulo que o campo faz com o eixo y pode ser visto na figura 4.5. Uma variação menor ou igual 5° (figura 4.5 – faixa amarela) equivale a uma variação inferior a 1% no valor do campo.

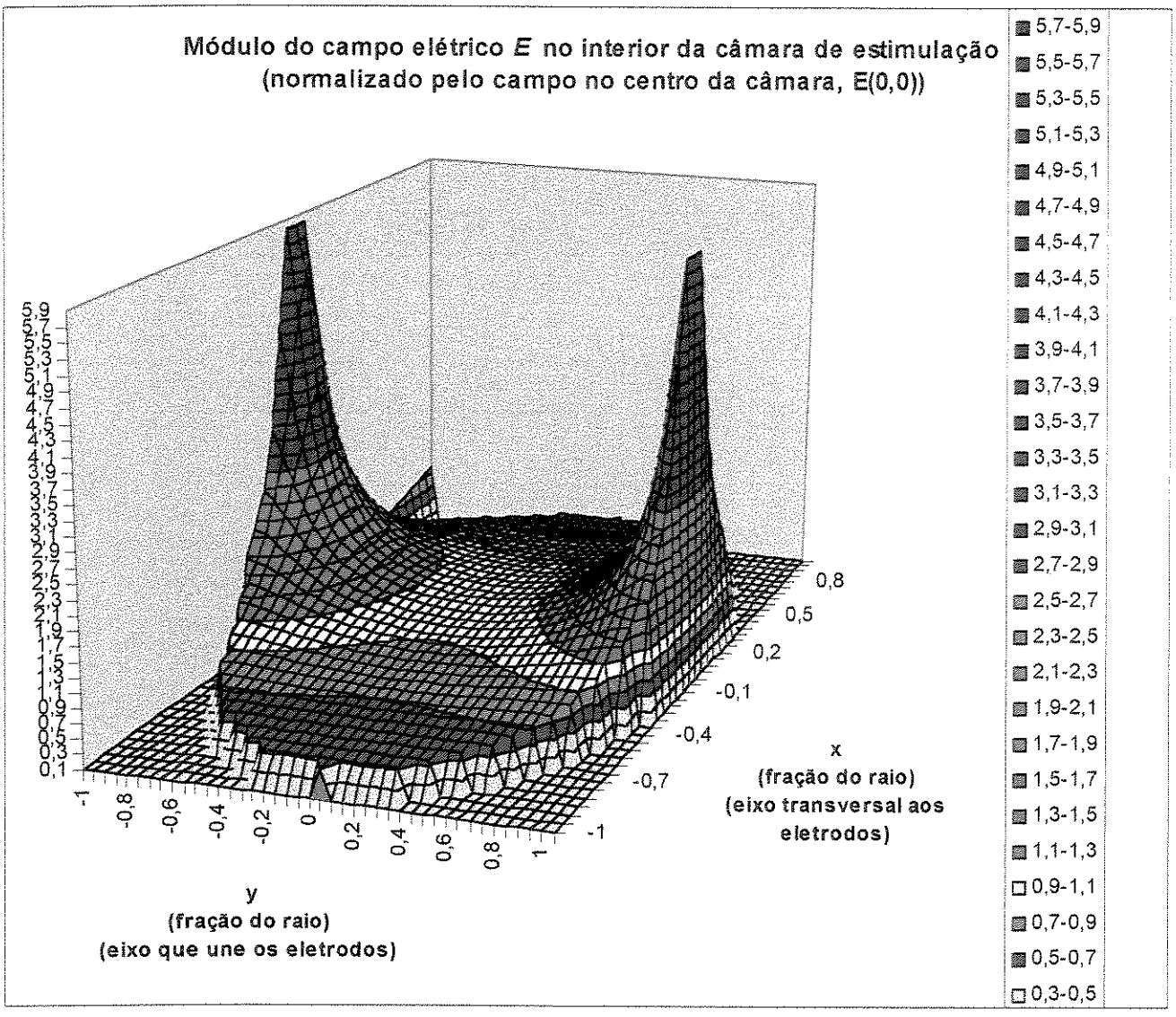


Figura 4.4 – Módulo do campo elétrico no interior da câmara de estimulação em 3D. A área de trabalho, definida a seguir, é uma região circular central interior da faixa de campo cujo módulo(normalizado) varia entre 0,9 e 1,1 (faixa amarela).

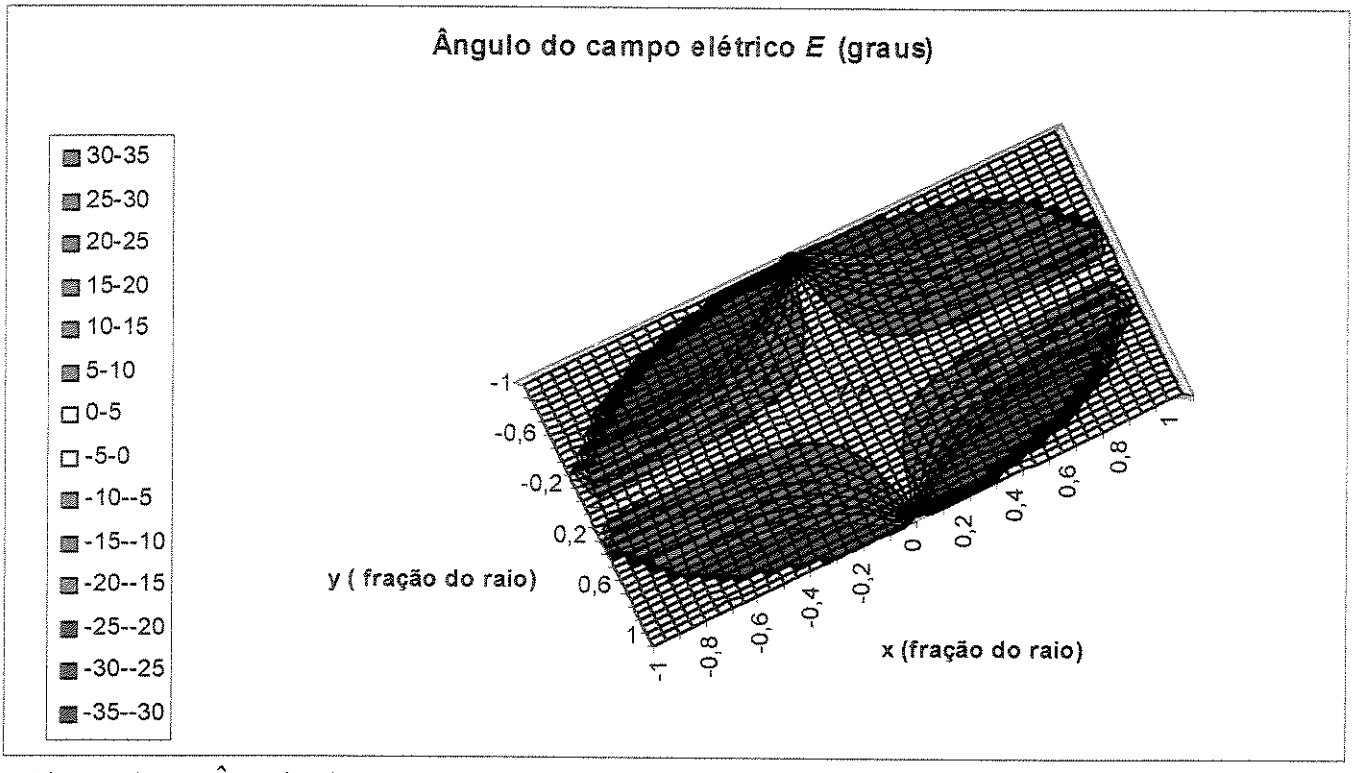


Figura 4.5 – Ângulo do campo elétrico em relação ao eixo y (eixo que une os eletrodos de estimulação) no interior da câmara de estimulação em 3D. A faixa amarela representa a região onde há uma variação menor ou igual 5° implicando numa variação inferior a 1% no valor do campo.

4.2 - ÁREA DE TRABALHO ESTABELECIDA A PARTIR DAS BASES TEÓRICAS

Delimitamos uma região central na câmara onde o desvio do campo em relação ao campo no centro seja conhecido e tolerável. Deste modo, as células presentes nesta região ficam submetidas a um campo elétrico conhecido independentemente de sua posição exata.

Para delimitarmos o raio dessa região central, calculamos o desvio do campo em qualquer ponto em relação ao centro. O campo elétrico no centro da câmara é dado pela equação 4.16, sendo esta a equação utilizada para determinação do campo elétrico no decorrer do trabalho. O desvio relativo do campo em relação ao centro quando y=0 é dado pela equação 4.17. A equação 4.18 descreve o campo quando y=0. Este desvio é ilustrado na figura 4.6. O mesmo procedimento foi realizado para x=0 (equações 4.19 e 4.20). Na figura 4.7 é ilustrado o desvio relativo do campo em relação ao centro quando x=0.

$$\bar{E}(0,0) = \frac{2I}{b\pi\sigma h}\hat{a}_y \qquad \text{eq. 4.16}$$

$$\frac{\bar{E}(x,0) - \bar{E}(0,0)}{\bar{E}(0,0)} \qquad \text{eq. 4.17;} \qquad \bar{E}(x,0) = \frac{2Ib}{\pi\sigma h}\left[\frac{1}{x^2 + b^2}\right]\hat{a}_y \qquad \text{eq. 4.18}$$

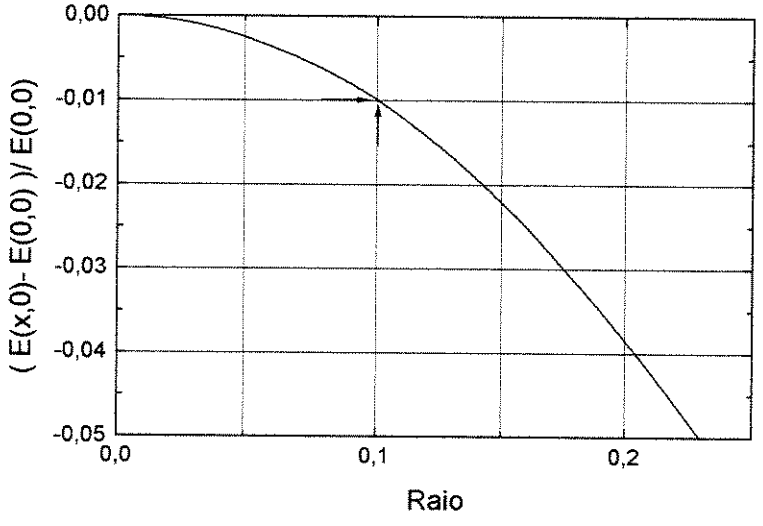


Figura 4.6 – Desvio relativo do campo quando y=0 (eixo transversal aos eletrodos de estimulação)

$$\frac{\bar{E}(0,y)-\bar{E}(0,0)}{\bar{E}(0,0)} \qquad \text{eq. 4.19;} \qquad \bar{E}(0,y) = -\frac{2Ib}{\pi\sigma h}\left[\frac{1}{y^2-b^2}\right]\hat{a}_y \qquad \text{eq. 4.20}$$

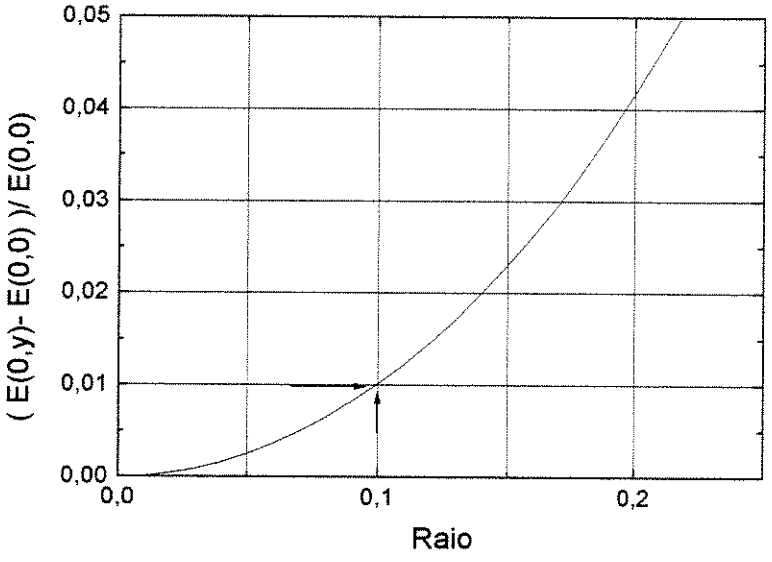


Figura 4.7 – Desvio relativo do campo quando x=0 (eixo que une os eletrodos de estimulação)

Nas condições estabelecidas (vide figura 4.6 e 4.7), é encontrado um desvio relativo de 1% do campo em uma região central circular com raio igual a 10% do raio total da câmara. Isto equivale a uma área de trabalho de aproximadamente 12 mm^2 (câmara com b=20 mm) e 3 mm^2 (câmara com b=10 mm) onde, em ambas as câmaras, uma quantidade suficiente de células pode ser encontrada. Nesta área, o campo elétrico é descrito pela equação 4.16, ou seja, E(0, 0) = E (área de trabalho)

CAPÍTULO 5

MODELOS PARA ESTIMULAÇÃO POR CAMPO

5.1 – MODELO BIOLÓGICO

O modelo biológico assumido é ilustrado na figura 5.1. Quando em repouso, a célula cardíaca possui um potencial transmembrana, V_m (diferença de potencial entre o meio interno, V_i, e externo, V_e, da célula, $V_m = V_i - V_e$), de aproximadamente –85 mV, negativo dentro em relação ao meio externo (figura 5.1.A).

A membrana celular, estrutura formada por uma bicamada de fosfolípides, cria uma barreira de difusão entre os meios interno e externo da célula. Distribuídas pela membrana, há várias proteínas (canais, trocadores e bombas) responsáveis pelo transporte transmembrana de íons do meio externo para o meio interno e vice-versa. Dentre estas, estão os canais controlados por V_m (canais V_m-dependentes) de sódio, de potássio, de cálcio e outros.

Quando um campo elétrico **E** é aplicado a um volume condutor contendo células, gera-se um potencial V_e ao longo da superfície externa da célula. Como o potencial intracelular V_i pode ser considerado constante, V_m varia com V_e, a partir do repouso. Há, então, um rearranjo de cargas no interior da célula de modo a causar uma despolarização na parte da célula voltada

para o catodo (-) e uma hiperpolarização na parte voltada para o anodo (+) (figura 5.1.B). O processo de polarização é instantâneo, da ordem de microsegundos (Jeltsh, 1979), e deve depender da polarização de uma área suficientemente grande (equivalente ao fenômeno do comprimento mínimo, *liminal lengh*, que ocorre em nervos (Fozzard, 1972)) tal que a despolarização resultante seja capaz de abrir canais de sódio na área ativada. Quando o tempo de duração do estímulo for adequado para a amplitude aplicada (seguindo a curva intensidade-duração da célula – figura 6.9) permitindo uma entrada suficiente de íons sódio (figura 5.1.B), um PA é disparado. O PA possibilita o início do processo excitação-contração, que envolve a abertura de canais de cálcio e o influxo deste íon e culmina com a contração celular (figura 5.1.C).

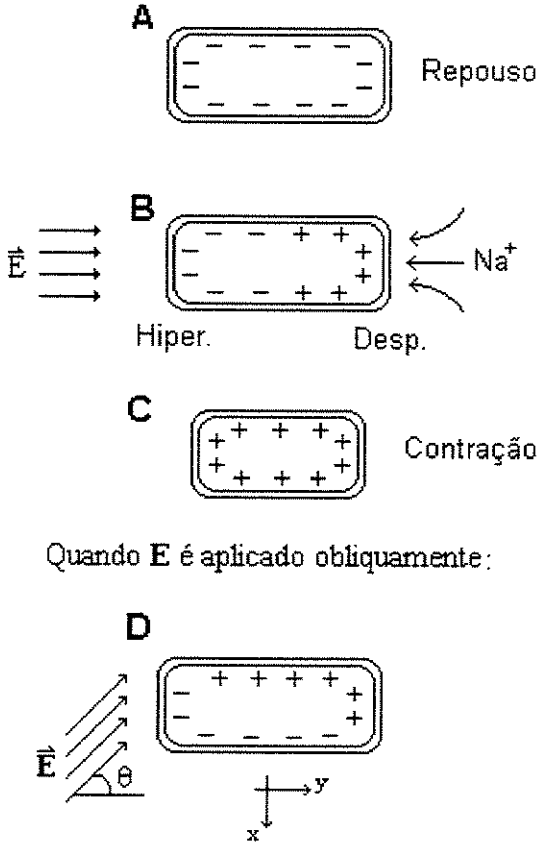


Figura 5.1- Modelo Biológico

Em nosso experimentos, o campo limiar (E_L) é o campo capaz de induzir uma contração que é o parâmetro que pode ser observado no microscópio em nosso aparato experimental (figura 3.6).

Quando **E** é aplicado obliquamente (figura 5.1.D), o rearranjo de cargas acompanha a inclinação do campo, deslocando a área de despolarização e hiperpolarização.

5.2 – MODELO ELETROMAGNÉTICO

Este modelo foi proposto por Klee e Plonsey (1976) que analisaram, teoricamente, o efeito da geometria e das dimensões da célula sobre a despolarização local máxima da membrana (V_{max}), quando um campo elétrico externo $\boldsymbol{E}$ é aplicado.

A célula foi representada por um esferóide prolato (figura 5.2) dado pela equação 5.1.

$$\frac{x^2}{a^2}+\frac{y^2}{a^2}+\frac{z^2}{c^2}=1 \qquad \text{eq. 5.1}$$

onde c e a são, respectivamente, os semi eixos maior e menor da célula.

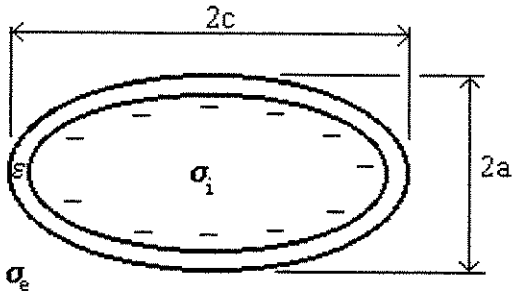


Figura 5.2 – Representação da célula no modelo proposto por Klee e Plonsey (1976). Um esferóide prolato com eixo maior 2c e menor, 2a. Os meios interno e externo são uniformes, homogêneos e condutores ôhmicos com condutividades σ_i e σ_e , respectivamente. A membrana é considerada um dielétrico ideal (constante dielétrica ε). Em repouso, a célula possui um potencial interno negativo em relação ao meio externo.

Usando as condições de contorno apropriadas, a equação de Laplace foi resolvida para achar a despolarização V_m induzida por **E** (**E** = E_{ox}**x** + E_{oy}**y** + E_{oz}**z**). A solução encontrada pelos autores é dada pela equação 5.2.

$$V_m(x,y,z) \cong (E_{ox}x + E_{oy}y)A + (E_{oz}z)C \qquad \text{eq. 5.2}$$

onde E_{ox}, E_{oy} e E_{oz} são, respectivamente, as componentes do campo nas direções x, y e z, A e C são fatores que dependem apenas de a e c, portanto puramente geométricos, dados pelas equações 5.3 e 5.4, respectivamente.

$$A = \left\{1 - 0{,}5\,\epsilon^{-2} - \left[0{,}25(1-\epsilon^2)\ln\frac{1-\epsilon}{1+\epsilon}\right]\epsilon^{-3}\right\}^{-1} \qquad \text{eq. 5.3}$$

$$C = \left\{ \epsilon^2 + \left[0{,}5(1-\epsilon^2) \ln \frac{1-\epsilon}{1+\epsilon} \right] \epsilon^{-3} \right\}^{-1} \qquad \text{eq. 5.4}$$

$$\epsilon = \left(1 - \frac{a^2}{c^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

A equação 5.5 nos dá o valor da despolarização local máxima (V_{max}) induzida pelo campo **E,** obtida a partir da equação 5.2.

$$V_{max}(x,y,z) = (E_{ox}{}^2 + E_{oy}{}^2)a^2A^2 + (E_{oz}{}^2)c^2C^2 \qquad \text{eq. 5.5}$$

Quando o campo foi restrito ao plano xz, pode-se definir o ângulo de aplicação do estimulo $\theta_0 \left(\theta_0 = \tan^{-1} \frac{E_{ox}}{E_{oz}} \right)$ e assim teremos, finalmente, V_{max} dado pela equação 5.6 .

$$V_{max}(E_0, \theta_0, a, c) = E_o(a^2A^2 \operatorname{sen}^2\theta_0 + c^2C^2 \cos^2 \theta_0)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{eq. 5.6}$$

Por meio desta última equação, constata-se que V_{max} depende da geometria da célula (a e c), da magnitude do campo aplicado E_0 e do ângulo θ_0 entre o campo aplicado e o eixo maior da célula.

Em nossos experimentos, quando E_L é alcançado podemos obter V_L cuja expressão (equação 5.7) é dada pela substituição de E_0 por E_L na equação 5.6.

$$V_L(E_L, \theta_0, a, c) = E_L(a^2A^2 \operatorname{sen}^2\theta_0 + c^2C^2 \cos^2\theta_0)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{eq. 5.7}$$

Se o campo **E** for aplicado na direção do eixo maior da célula ($\theta_0 = 0°$), ou seja, onde obtemos o campo limiar longitudinal ($E_{//}$), a despolarização local da membrana na direção longitudinal ($V_L^{//}$) é dada pela equação 5.8. Caso a direção de aplicação de **E** seja transversal ao eixo maior da célula ($\theta_0 = 90°$), registraremos campo limiar transversal ($E_\perp$), e a despolarização local na direção transversal é descrita pela equação 5.9.

$$V_L^{//}(E_{//}, 0, a, c) = E_0\, c\, C \qquad \text{eq. 5.8}$$

$$V_L^{\perp}(E_\perp, 0, a, c) = E_\perp\, a\, A \qquad \text{eq. 5.9}$$

Para $E_{//}$, a despolarização local da membrana depende fortemente de c e levemente de a, aumentando quando c é fixo e a tende a c (equações 5.3 e 5.8). Para $E_\perp$, temos que V_L depende fortemente de a e aumenta quando a é fixado e c aumentado (equações 5.4 e 5.9). Deste modo, em ambos os casos, o aumento das dimensões celulares leva ao aumento de V_L.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 - MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

Antes de efetuarmos as medições da condutividade da solução de Tyrode, testamos o sistema para medição de condutividade (capítulo 3, figura 3.5) realizando medidas para soluções de KCl (figura 6.1). O sal monovalente KCl é um dos componentes da solução de Tyrode (capítulo 3, seção 3.3) cuja condutividade, σ_{KCl}, já foi calculada e medida experimentalmente por outros autores (Benedek e Villars, 1979; Palmer, 1962; Gurney, 1962 Schementschenko e Serpinskii, 1933). Deste modo podemos fazer uma comparação entre os resultados experimentais obtidos em nosso laboratório com os resultados experimentais encontrados na literatura e com o valor teórico, $\sigma_{KCl}(teo)$ (capítulo 3, equação 3.5).

Na figura 6.1 também é ilustrado σ_{KCl} encontrados por Schementschenko e Serpinskii (1933) e por Palmer (1962) para soluções de KCl em várias concentrações. Os valores experimentais de σ_{KCl} obtidos em nosso laboratório diferem menos que 5% dos valores experimentais relatados na literatura.

Após testarmos o sistema, realizamos as medidas de condutividade da solução de Tyrode, σ_{Tyrode}. Obtivemos o seguinte resultado:

$\sigma_{Tyrode} = 0{,}0146 \pm 0{,}0006\ \Omega^{-1}.cm^{-1}$

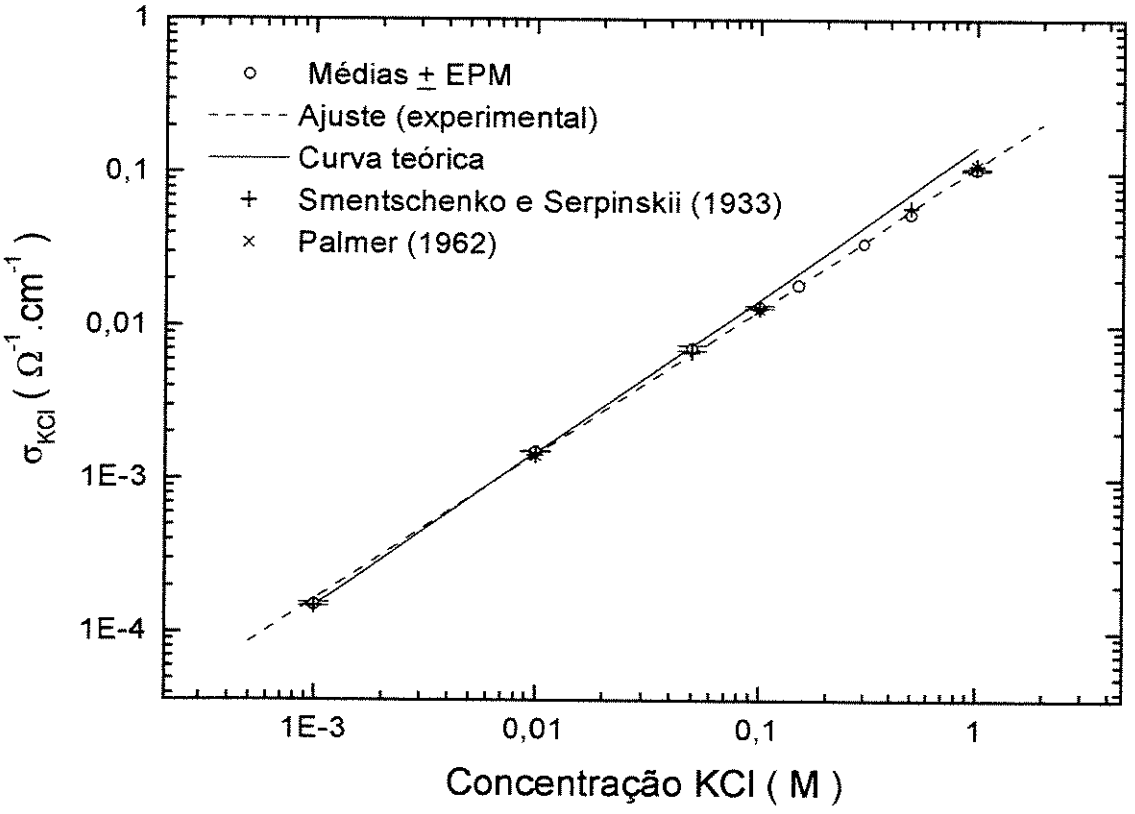


Figura 6.1 – Condutividade da solução de KCl, σ_{KCl}, em função da concentração desta solução. Os dados experimentais obtidos em nosso laboratório são representados por média ± EPM (o). Para algumas concentrações, são ilustrados os dados experimentais encontrados por Palmer,1962 (×) e de Schementschenko e Serpinskii,1933 (+). A curva tracejada (y = 0,942x - 0,95; R=1) ilustra o ajuste dos dados experimentais utilizando-se do método dos mínimos quadrados. O resultado teórico é mostrado pela curva sólida traçada a partir da equação 3.5.

6.2 – MAPEAMENTO DO CAMPO ELÉTRICO

A figura 6.2 ilustra o potencial ao longo do eixo que une os eletrodos (eixo y). O potencial elétrico ao longo do eixo y é dado pela equação 6.1 (resultado particular da equação 4.15)

$$\phi(0,y) = -\frac{I}{\pi\sigma h}\ln\frac{|y+2|}{|y-2|} \qquad \text{eq. 6.1}$$

onde I é a corrente que atravessa a solução fisiológica, σ é a condutividade da solução fisiológica e h é a altura da câmara de estimulação.

Ao compararmos os resultados teóricos e experimentais, observamos um desvio relativo menor que 4%, mostrando uma boa concordância entre os resultados.

A partir dos dados de potencial elétrico ao longo do eixo y, obtivemos o campo elétrico $\boldsymbol{E}$ no interior da câmara na linha que une os eletrodos. Na figura 6.3, comparamos os dados experimentais com o resultado teórico. Deste modo, delimitamos uma região onde conhecemos o campo elétrico ao qual a célula é submetida quando estimulada, com um erro menor que 4%.

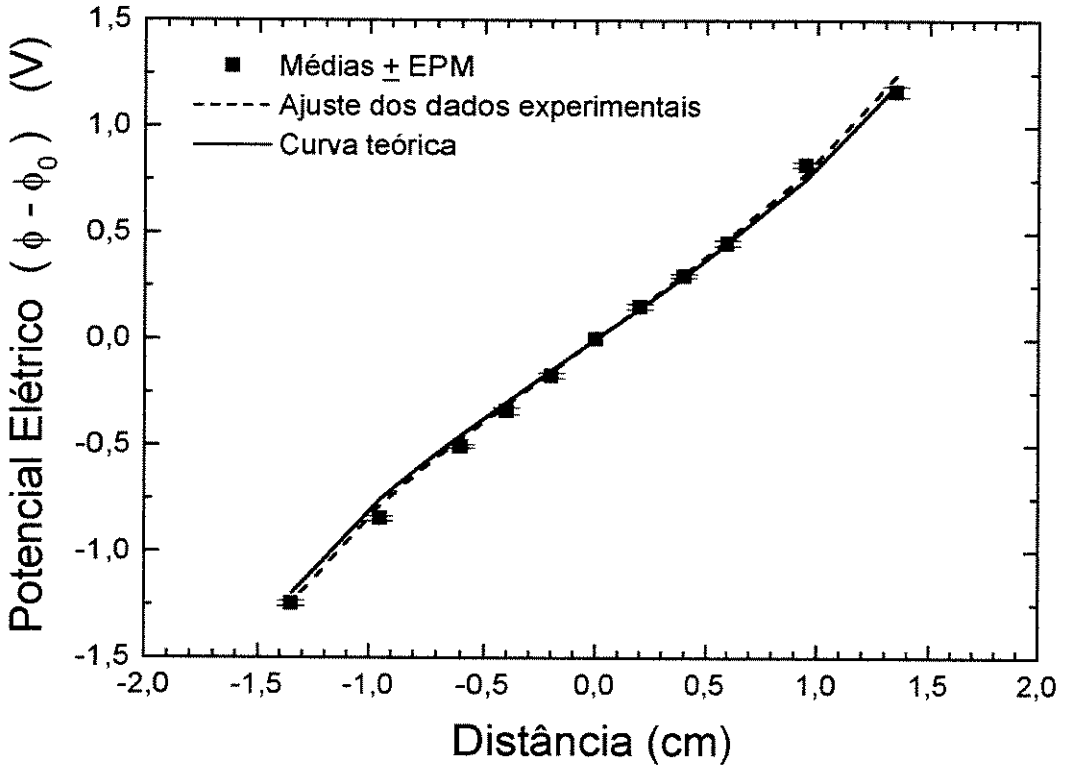


Figura 6.2 – Potencial elétrico ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação (eixo *y*) em função da distância do eletrodo central. Os dados experimentais são representados por média ± EPM (■, n=6). A curva tracejada ilustra o ajuste dos dados experimentais utilizando-se do método dos mínimos quadrados. O resultado teórico é mostrado pela curva sólida. A diferença relativa entre o ajuste experimental e a curva teórica é de 3,6%. ϕ_0 é o potencial do eletrodo central, usado como referência.

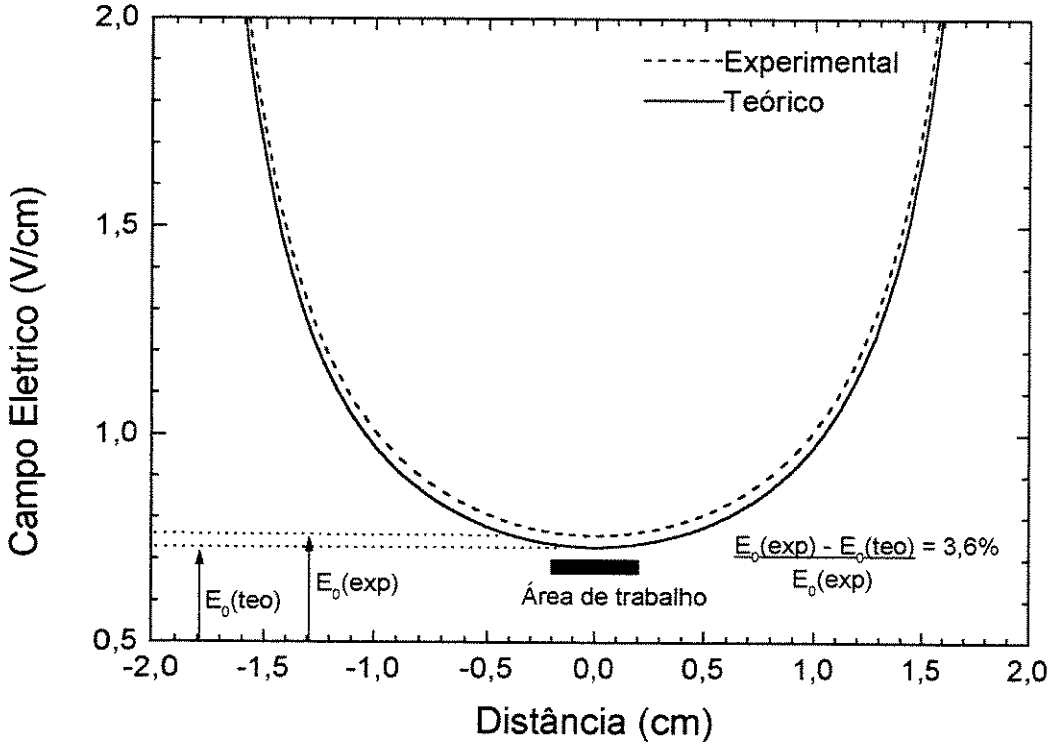


Figura 6.3 – Campo elétrico ao longo do eixo que une os eletrodos de estimulação em função da distância do eletrodo central. A curva sólida indica o resultado teórico e a tracejada, o resultado experimental. No centro, a diferença relativa entre o campo obtido experimentalmente, $E_0(exp)$, e o campo obtido analiticamente, $E_0(teo)$, é de 3,6%.

A figura 6.4 ilustra o potencial elétrico ao longo do eixo transversal ao eixo que une os eletrodos (eixo x). Os dados experimentais foram obtidos pelo sistema descrito no capítulo 3 (seção 3.5.1).

A partir da equação 4.10, temos que o potencial elétrico ao longo do eixo x , ou seja potencial elétrico para y=0, é nulo (ϕ (x, 0)=0). Na figura 6.4, observamos que os resultados teórico e experimental não são divergentes.

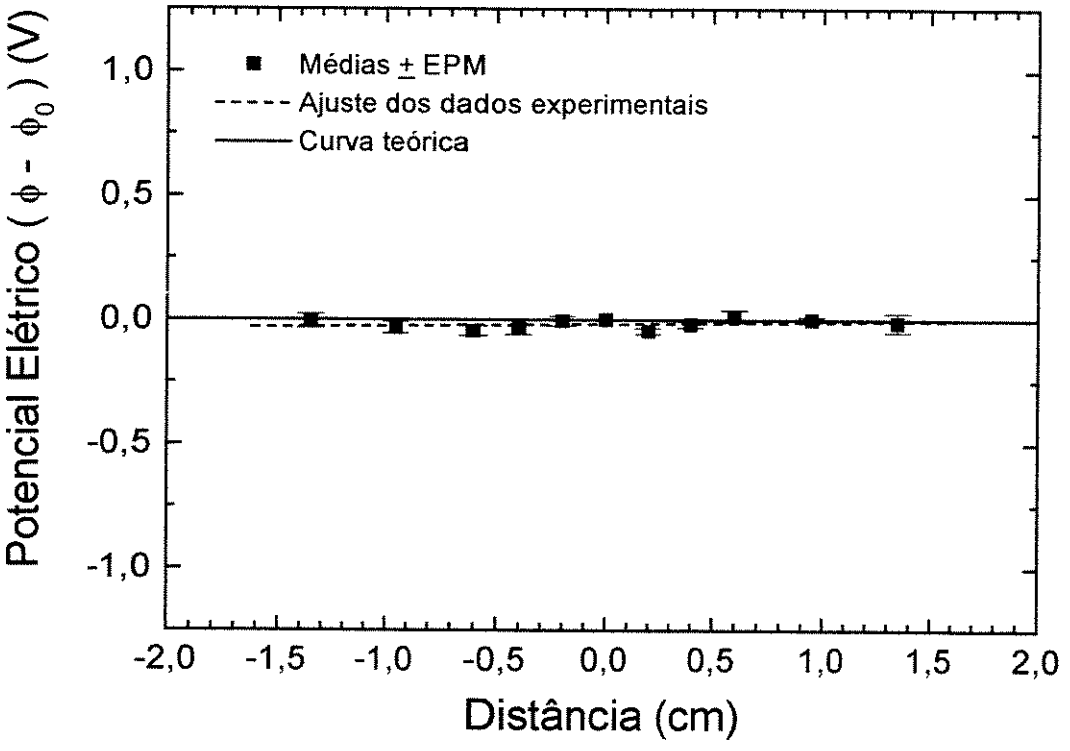


Figura 6.4 – Potencial elétrico ao longo do eixo transversal ao eixo que une os eletrodos de estimulação (eixo x) em função da distância do eletrodo central. Os dados experimentais são representados por média ± EPM (■, n=6). A curva tracejada ilustra o ajuste dos dados experimentais utilizando-se do método dos mínimos quadrados. O resultado teórico é mostrado pela curva sólida. ϕ_0 é potencial do eletrodo central usado como referência.

6.3 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

A figura 6.5 ilustra E_L e V_L em função de θ (gráfico polar) para uma célula típica. Observe que E_L na direção longitudinal ($E_{long} \approx 2,17$ V/cm) é aproximadamente a metade de E_L na direção transversal ($E_{transv} \approx 5,25$ V/cm). Os dados experimentais do campo para as demais direções encontram-se na tabela 6.1

A partir das dimensões celulares (valores de a e c - canto direito da figura 6.5), de E_L e de θ obtivemos os valores de V_L (equação 5.7) nas 12 direções de estimulação (vide tabela 6.1).

Tabela 6.1 – Dados experimentais de E_L e V_L em função de θ para a célula típica .

θ (graus)	E_L (V/cm)	V_L (mV)	θ (graus)	E_L (V/cm)	V_L (mV)
0	1,99	13,97	180	2,17	15,24
30	2,35	14,72	210	2,35	14,72
60	3,08	13,4	240	3,26	14,19
90	5,61	16,72	270	5,25	15,64
120	3,98	17,34	300	3,8	16,55
150	2,53	15,85	330	2,35	14,72
Polaridade 1			Polaridade 2		

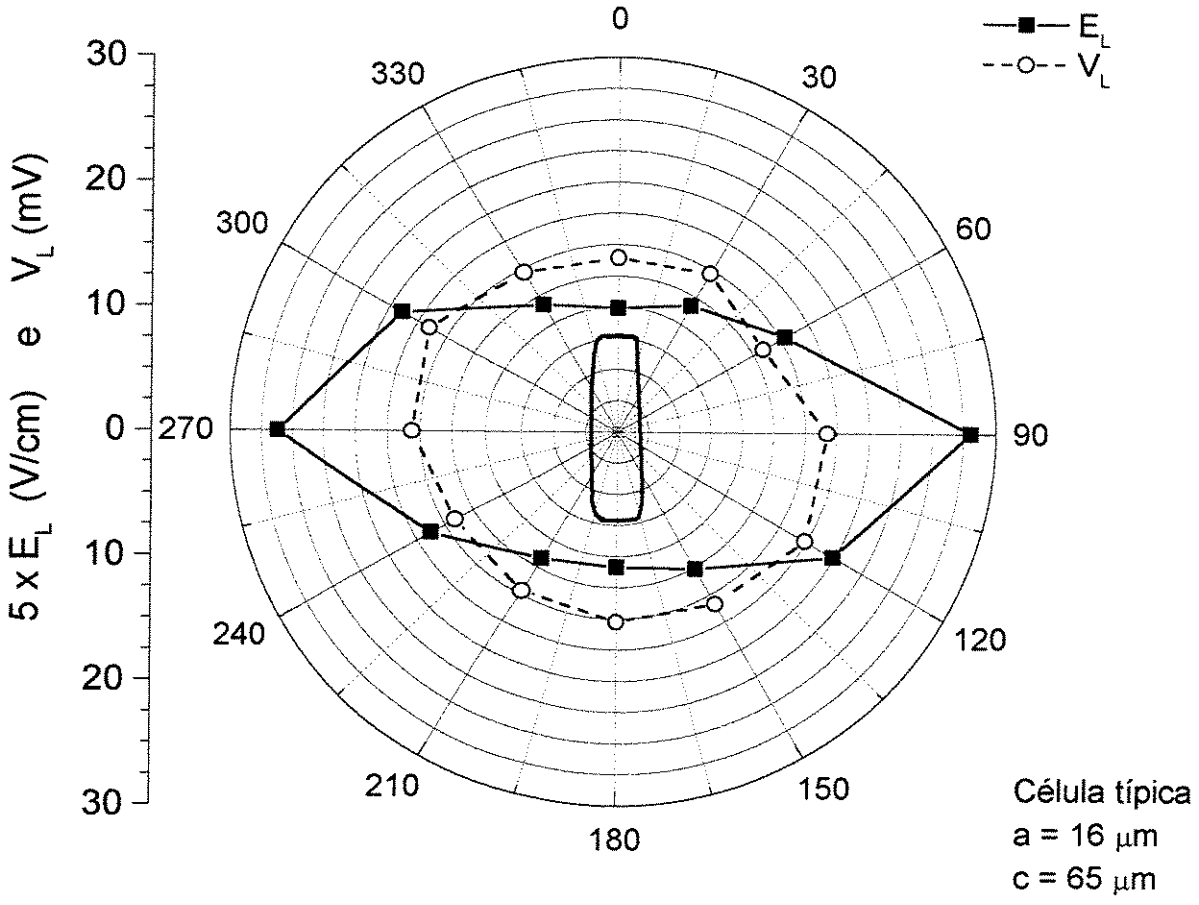


Figura 6.5 – Gráfico polar de E_L (■) e V_L(○) em função de θ, para uma célula típica nas 12 direções de estimulação

A figura 6.6 ilustra a média de E_L e V_L (gráfico polar). Observe que o número de células estimuladas em cada direção é diferente, principalmente na direção transversal. Isto aconteceu porque iniciamos as medições em células usando a câmara de estimulação com raio igual a 20 mm cujo campo elétrico máximo na região de trabalho, E_{max}, era de aproximadamente 4,5 V/cm . Este campo foi insuficiente para estimular várias das células na direção transversal. Por isso construímos a nova câmara (b = 10 mm) onde pudemos obter

E_{max} em torno de 9 V/cm, suficiente para estimular a maioria das células em todas as direções, nas condições estudadas.

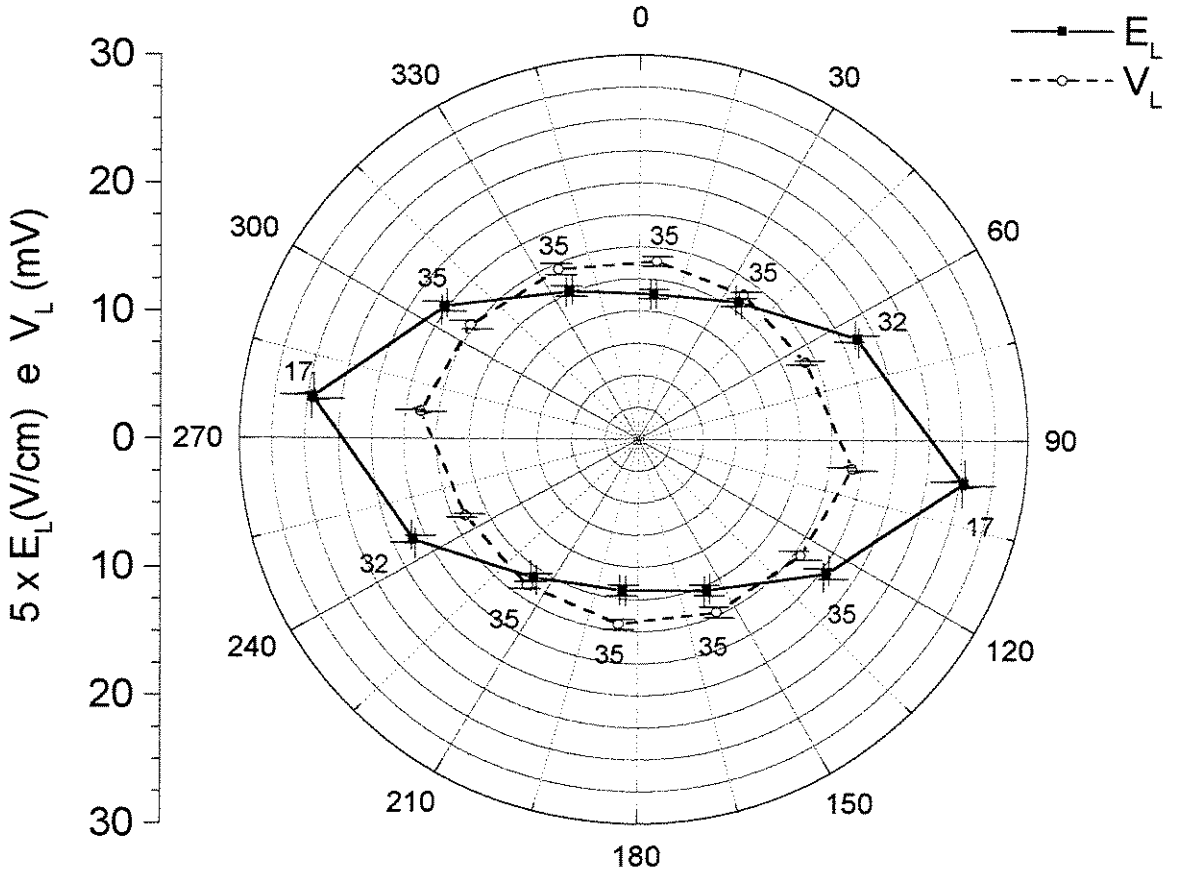


Figura 6.6 – Gráfico polar da média de E_L(■) ± EPM e V_L(o) ± EPM em função de θ. Os números próximos aos símbolos indicam a quantidade de células (n) estimuladas em cada direção.

A média dos dados experimentais do campo em função de θ para em todas direções medidas são mostrados na tabela 6.2

Tabela 6.2 – Média ± EPM de E_L e V_L em função de θ .

θ (graus)	E (V/cm)	V_L (mV)	θ (graus)	E (V/cm)	V_L (mV)
5,57 ± 1,07	2,28 ± 0,07	13,97 ± 0,37	185,57 ± 1,07	2,37 ± 0,08	14,49 ± 0,4
35,57 ± 1,07	2,64 ± 0,08	13,91 ± 0,31	215,57 ± 1,07	2,66 ± 0,08	14,03 ± 0,33
64,91 ± 1,08	3,74 ± 0,13	14,25 ± 0,38	244,91 ± 1,08	3,70 ± 0,13	14,08 ± 0,33
97,65 ± 1,53	5,06 ± 0,26	16,75 ± 0,83	277,65 ± 1,53	4,94 ± 0,28	16,36 ± 0,81
125,57 ± 1,07	3,59 ± 0,14	15,49 ± 0,62	305,57 ± 1,07	3,55 ± 0,13	15,3 ± 0,57
155,57 ± 1,07	2,58 ± 0,09	14,71 ± 0,45	335,57 ± 1,07	2,54 ± 0,09	14,58 ± 0,47
Polaridade 1			Polaridade 2		

Na figura 6.7 são ilustradas as médias de E_L e V_L em função de θ. Os valores de V_L foram calculados por meio da equação de Klee e Plonsey (1976) (capítulo 5, equação 5.7) a partir dos dados experimentais de E_L, da geometria de cada célula (a e c) e de θ. Para o ajuste de E_L feito também por meio da equação de Klee e Plonsey (1976), tomamos os valores médios de a (15,99 ± 3,21 μm), c (56,84 ± 6,36 μm), A (1,83 ± 0,01) e C (1,10 ± 0,01). O parâmetro variável no ajuste, neste caso, foi V_L que atingiu o valor de 14,9 ± 0,19 mV.

Constatamos que E_L é mínimo quando θ = 0° (E_L= 2,28 ± 0,07 V/cm) e máximo quando θ = 90° (E_L= 5,06 ± 0,26 V/cm), ou seja, o campo limiar na direção longitudinal é aproximadamente a metade do campo limiar na direção transversal.

Definimos como polaridade 1 as medições feitas com θ entre 0° e 180° e polaridade 2, as medições feitas com θ entre 180° e 360°.

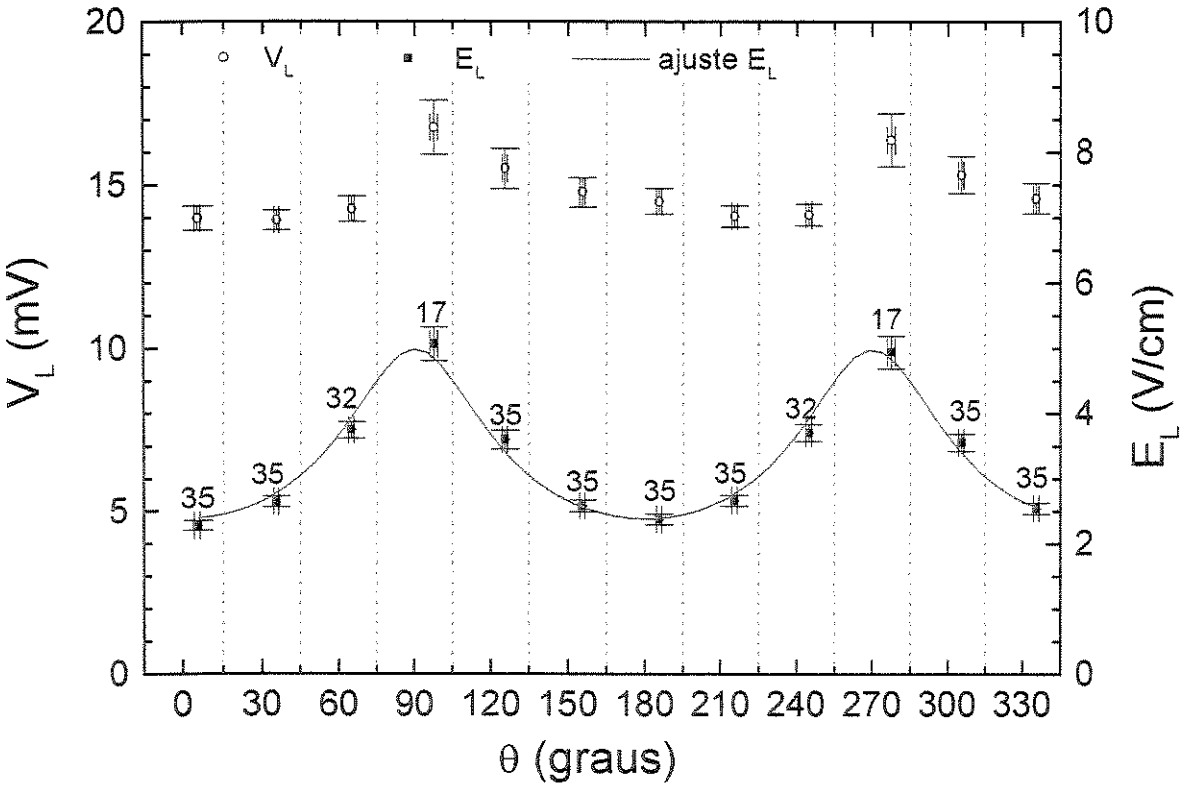


Figura 6.7 – V_L (○) ± EPM (ordenada esquerda) e E_L(■) ± EPM (ordenada direita) em função de θ. As linhas tracejadas delimitam o setor circular de 30° centrado na posição do eletrodo (vide seção 3.5.3). Acima de cada símbolo, está indicado o número de células estimuladas em cada direção. A curva vermelha ilustra o ajuste de E_L feito por meio da equação de Klee e Plonsey (1976). Polaridade 1: $0° \leq \theta < 180°$. Polaridade 2: $180° \leq \theta < 360°$.

Realizamos a análise bifatorial de E_L considerando como fatores de variância o ângulo θ e a polaridade. Concluímos que há uma influência significativa ($P<0,001$) do ângulo θ sobre E_L, que pode ser observada claramente na figura 6.7, mas a influência de θ sobre E_L independe da polaridade. Constatou–se também que não há influência significativa da polaridade sobre E_L.

A análise de variância bifatorial foi também realizada para V_L considerando como fatores de variância o ângulo θ e a polaridade. Concluímos que há uma influência significativa ($P<0,025$) do ângulo θ sobre V_L, mas a influência de θ sobre V_L independe da polaridade. Não há influência significativa da polaridade sobre o V_L.

A figura 6.8 ilustra a razão entre a média de E_L transversal ($E_\perp$) e E_L longitudinal ($E_{//}$) obtidos experimentalmente e teoricamente a partir do modelo eletromagnético proposto por Klee e Plonsey (1976) (equação 5.7). Nestes cálculos, tomamos o valor médio $\frac{cC}{aA}$ e consideramos V_L transversal igual a V_L longitudinal, esta simplificação pode nos dar uma boa estimativa da razão supracitada. Apesar de V_L variar estatisticamente com θ, a variação máxima é de apenas 10%.

Não houve diferença estatística entre os dados obtidos experimentalmente e o resultado teórico. Isto indica que a estimativa da razão $\frac{E_\perp}{E_{//}}$ pode ser feita com base apenas nas dimensões das células.

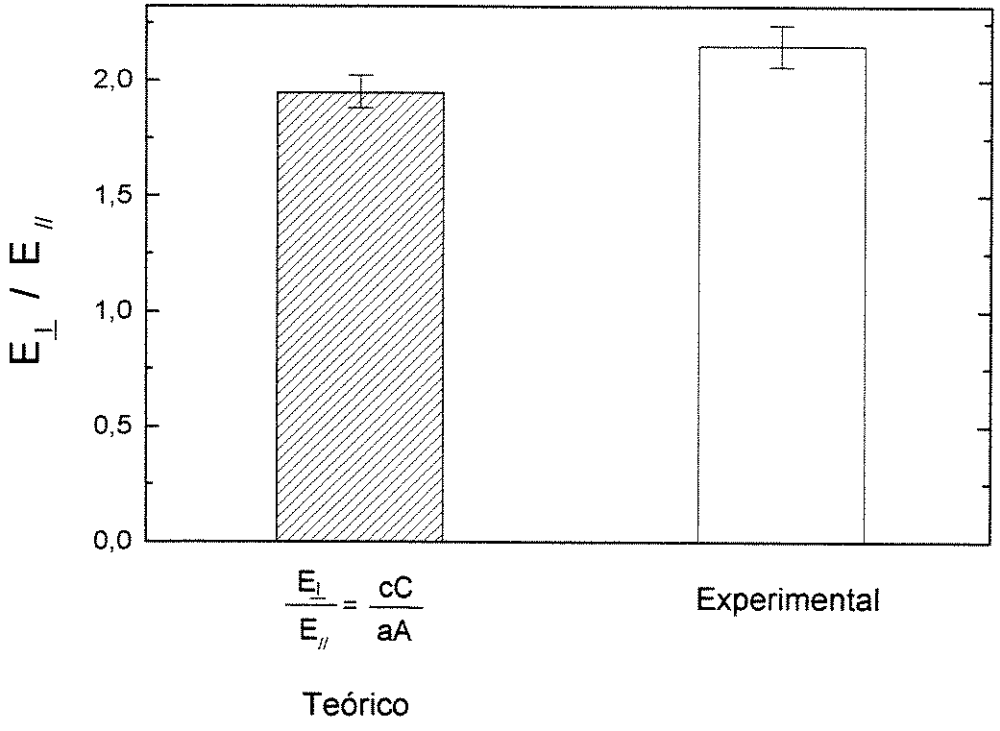


Figura 6.8 - Razão entre campo limiar transversal ($E_{\perp}$) e longitudinal ($E_{//}$) obtidos por meio da teoria ($\frac{cC}{aA} = 1{,}95 \pm 0{,}07$) e experimentalmente ($\frac{E_{\perp}}{E_{//}} = 2{,}15 \pm 0{,}09$).

A figura 6.9 ilustra a curva Intensidade *versus* duração obtida de células ventriculares de ratos a partir de estimulação por campo aplicado nas direções longitudinal e transversal ao eixo maior da célula. Os valores das cronaxias longitudinal e transversal não foram estatisticamente diferentes (1,61 ± 0,3 ms *vs* 1,28 ± 0,23 ms, respectivamente). O valor reobase longitudinal (23,54 ± 0,09 mA ou 2,14 ± 0,09 V/cm) difere ($P<0{,}001$) do valor reobase transversal (51,7 mA ou 4,7 ± 0,15 V/cm). Para todas as durações medidas, o limiar estimulatório transversal foi maior ($P<0{,}001$, $N=5$) que o limiar longitudinal.

Para pulsos estimulatórios bipolares, observamos que não há influência significativa da polaridade sobre E_L (figura 6.7). Para comprovarmos este resultado, eliminando a possibilidade que pulsos bipolares possam mascarar o efeito da diferença de polaridade, realizamos medições de limiar para pulsos monopolares e bipolares em ambas as polaridades, nas direções longitudinal (figura 6.10 A) e transversal (figura 6.10 B). Os dados destas medições estão dispostos na tabela 6.3. Observe que, para uma mesma polaridade (1 ou 2) e mesma forma de pulso (mono ou bipolar), o limiar transversal é aproximadamente o dobro do limiar longitudinal. Também foi constatado que, para uma mesma direção, o limiar obtido com pulsos monopolares é aproximadamente 30% maior que limiar obtido com pulsos bipolares.

Por meio de análise de variância bifatorial, verificamos o efeito da forma do pulso (monopolar ou bipolar) e da polaridade sobre E_L. Constatamos que, há uma influência significativa ($P< 0,01$) da forma do pulso sobre o E_L mas este efeito independe da polaridade. Não houve influência significativa da polaridade sobre o E_L .

Tabela 6.3 –Média ± EPM do limiar estimulatório obtido nas direções longitudinal e transversal em ambas as polaridades, com pulsos monopolares e bipolares.

	Limiar Longitudinal		Limiar Transversal	
	Polaridade 1	Polaridade 2	Polaridade 1	Polaridade 2
Monopolar	39,87 ± 3,13 mA (3,62 ± 0,28 V/cm)	40,69 ± 3,02 mA (3,69 ± 0,27 V/cm)	80,95 ± 4,18 mA (7,36 ± 0,38 V/cm)	82,39 ± 4,24 mA (7,49 ± 0,38 V/cm)
Bipolar	30,06 ± 2,70 m A (2,73 ± 0,25 V/cm)	30,56 ± 2,50 mA (2,77 ± 0,22 V/cm)	61,02 ± 3,42 mA (5,55 ± 0,31 V/cm)	62,45 ± 3,00 mA (5,67 ± 0,27 V/cm)

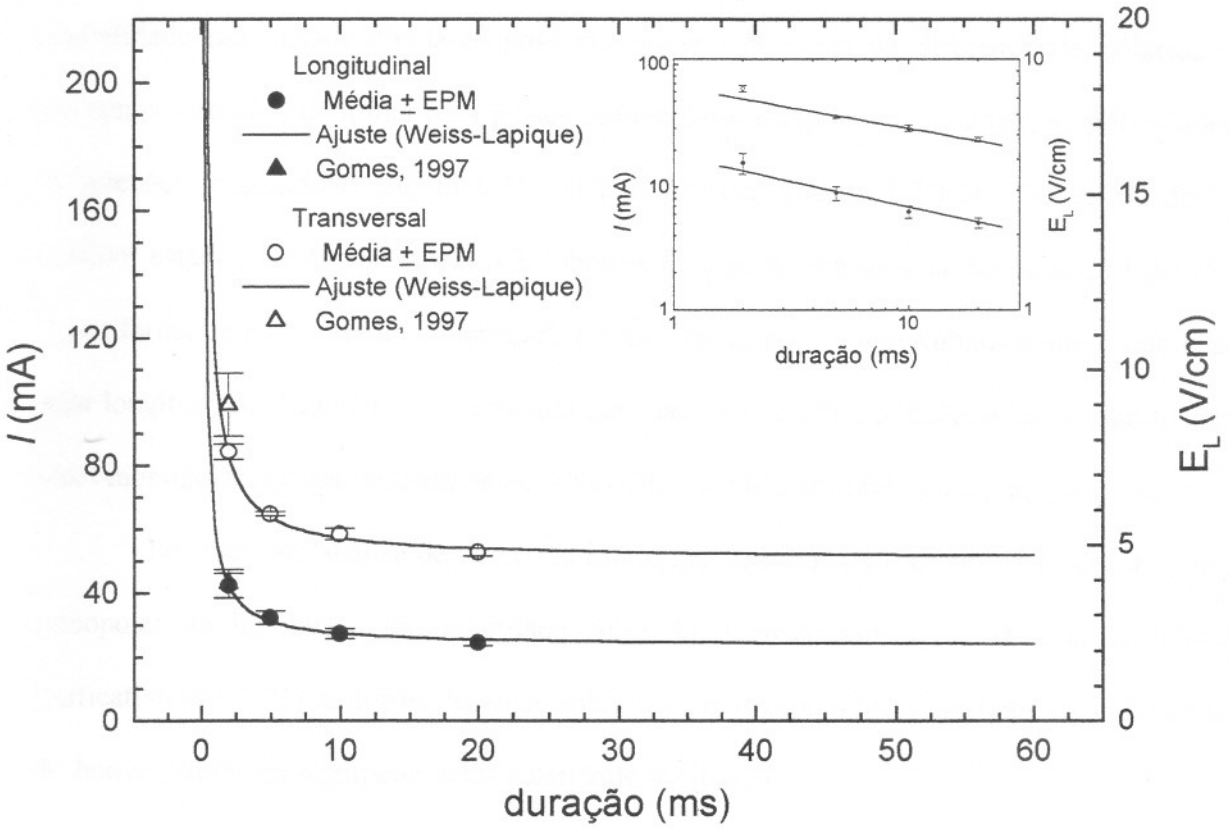


Figura 6.9 – Curva intensidade *versus* duração para I ± EPM (ordenada esquerda) e E_L ± EPM (ordenada direita) em algumas durações (2, 5, 10 e 20 ms) nas direções longitudinal (●) e transversal (○). Para todas as durações medidas, o limiar na direção transversal é aproximadamente o dobro do limiar na direção longitudinal. O ajuste das curvas em ambas as direções foi feito por meio da curva empírica de Weiss-Lapicque (eq. 3.6). Para duração de 2 ms, são ilustrados os dados experimentais de Gomes (1997) na direção longitudinal (▲) e transversal (Δ). Inserção: Curva ixd em escala log-log (ajuste linear na direção longitudinal y=0,61-0,2x; R=0,983 e na direção transversal y=0,88 – 0,15x; R = 0,972).

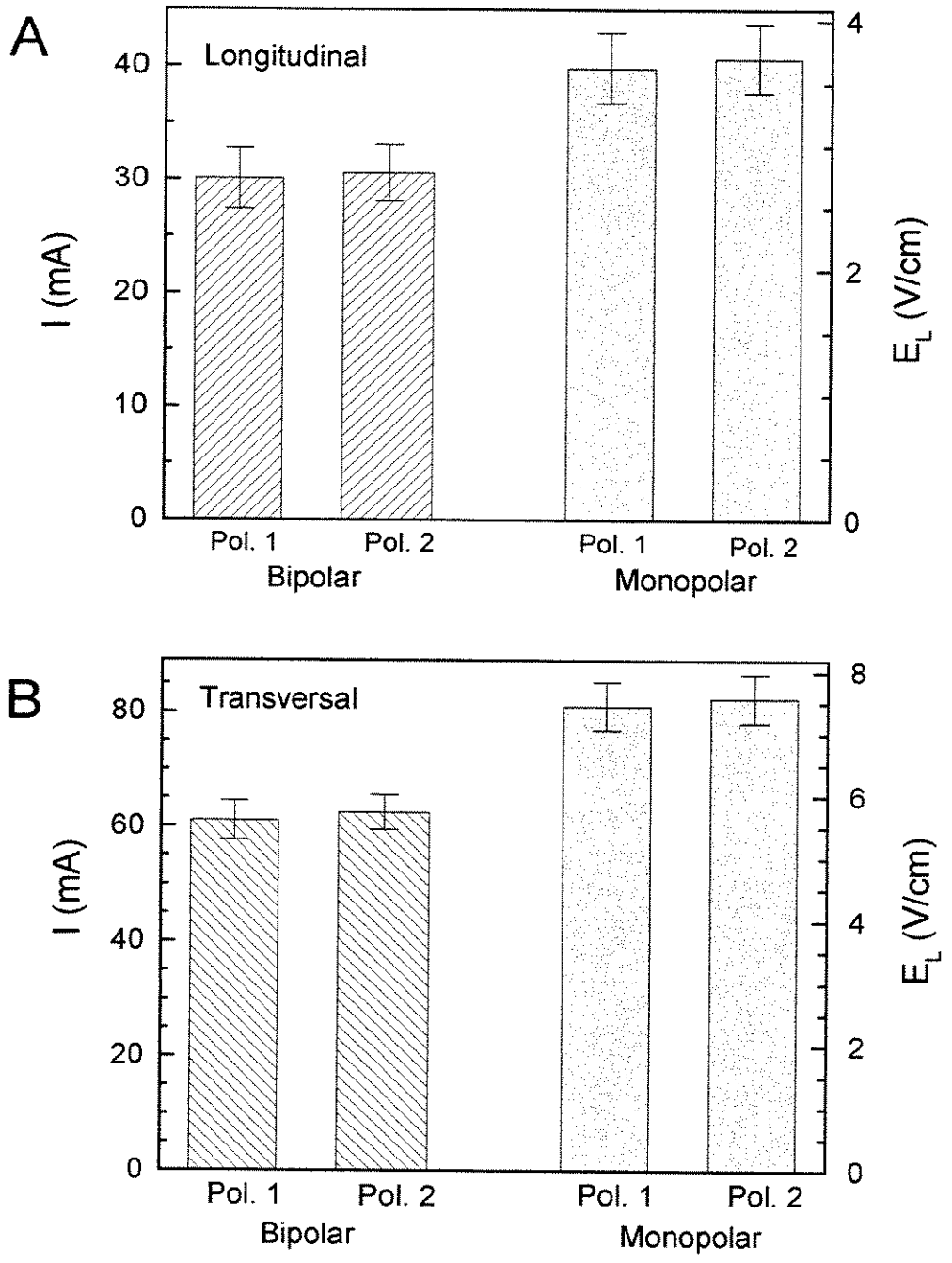


Figura 6.10 – Limiar estimulatório I (mA) ± EPM (ordenada esquerda) e E_L ± EPM (ordenada direita) obtido com pulsos monopolares e bipolares na direção longitundinal (A) e transversal (B) para polaridades 1 e 2.

CAPÍTULO 7

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO

A medição da condutividade da solução de Tyrode foi necessária para efetuarmos o cálculo de $\boldsymbol{E}$ (equação 4.14). Antes porém, testamos o sistema (figura 3.5) medindo a condutividade σ_{KCl} de soluções de KCl com concentrações variando de 1mM a 1M (figura 6.1). Valores experimentais e teóricos da condutividade da solução de KCl já são conhecidos da literatura (Palmer, 1962; Gurney, 1962; Benedek e Villars, 1979; Horvath, 1985; Lobo, 1989).

Para a concentração de 1mM de KCl, o desvio relativo entre os valores experimentais obtidos em nosso laboratório e o valor teórico foi de 2,7%. À medida que a concentração de KCl aumenta, este desvio crescia até atingir valores superiores a 25% para 1M de KCl. Isto acontece devido a alguns fatores discutidos a seguir.

Nos cálculos da condutividade (capítulo 3, seção 3.5.2) não se levou em consideração que a mobilidade ($\mu_{\pm} = \frac{D_{\pm}}{kT}$) dos íons pudesse depender da concentração (Benedek e Villars,

1979). Quando a concentração aumenta o efeito de blindagem do campo elétrico aplicado, causado pelos íons presentes na solução, não pode ser desprezado. Neste caso, a força elétrica e consequentemente a velocidade de *drift* (velocidade dos íons na solução, imposta pelo campo aplicado) diminui. Além disso, desprezamos nos cálculos a possibilidade de que a velocidade de *drift* de um íon fosse afetada pelo movimento dos íons vizinhos (Gurney, 1962; Benedek e Villars, 1979).

Foi encontrado na literatura (Palmer, 1962; Lobo, 1989) que os valores experimentais de σ_{KCl} em várias concentrações sofrem um desvio relativo crescente entre as medidas experimentais e a teoria à medida que a concentração aumenta. Comparando os valores experimentais obtidos em nosso laboratório e os encontrados na literatura obtivemos uma pequena discrepância de aproximadamente 5% para a maioria das concentrações medidas (figura 6.1). Isto indica uma boa concordância entre dados experimentais obtidos independentemente.

Além desses fatores incluídos nos cálculos, há ainda outros, pertinentes ao experimento. Uma das nossas dificuldades foi a de manter a estabilidade da cloretação dos eletrodos de Ag-AgCl (eletrodos de captação) em altas concentrações (a partir de 300 mM de KCl), indicando que havia uma reação entre a solução e os eletrodos de captação para tais concentrações.

Levando-se em consideração todos estes fatores, podemos assumir que as medidas experimentais para soluções de KCl e consequentemente as medições da condutividade da solução de Tyrode parecem confiáveis.

MAPEAMENTO DO CAMPO ELÉTRICO

Por meio de cálculos (capítulo 4), pudemos determinar um círculo central interno a câmara de estimulação com raio igual a 10% do raio total da câmara onde o valor campo variasse apenas 1%. Realizamos a montagem descrita pela figura 3.4 e constatamos, experimentalmente, um erro inferior a 4% entre medidas experimentais de $\boldsymbol{E}$ e o previsto pela teoria. Dentre os fatores que podem ter contribuído para o erro apresentado na figura 6.3, podemos citar os seguintes: cloretação individual diferente dos eletrodos de captação (eletrodo de Ag-AgCl), erro na medição da condutividade da solução de Tyrode (σ_{Tyrode}) e erro na determinação da altura(h) da solução no interior da câmara. Além dos erros inerentes aos instrumentos de medição e ao próprio modelo teórico utilizado.

Devido à dificuldade para realizarmos a cloretação simultânea de 11 eletrodos de Ag, cada eletrodo foi cloretado individualmente. Isto pode ter gerado um depósito de AgCl diferente em cada um deles, acarretando diferentes potenciais de meia-célula e, principalmente, afetando a impedância do eletrodo (que depende da espessura do depósito).

Ao longo do eixo x (eixo transversal ao eixo que une os eletrodos) (figura 6.4), a ligeira discordância entre o resultado teórico e o potencial elétrico medido experimentalmente pode ser atribuída à cloretação individual dos eletrodos de captação e ao alinhamento não perfeito dos eletrodos ao longo deste eixo. Um desalinhamento da ordem do diâmetro do eletrodo (0,5 mm) seria suficiente para justificar o máximo desvio encontrado (4%). Ao longo do eixo y (eixo que une os eletrodos), no entanto, este desalinhamento causaria um erro inferior a 1%, podendo ser desprezado.

O campo foi mapeado experimental e teoricamente e com auxílio das figuras 4.4 e 4.5 podemos observar que ao longo do eixo x temos a menor variação do campo e ao longo do eixo y, a maior. Deste modo conhecemos o campo elétrico no interior da câmara e podemos concluir que o sistema para geração de campo elétrico uniforme (variação de 1%) possibilita a estimulação celular em 12 direções. Este procedimento estende a informação já existente na literatura (Bardou et al., 1990; Tung et al., 1991; Ranjan e Thakor, 1995; Gomes, 1997), onde na maioria dos casos a estimulação é realizada apenas nas direções longitudinal e transversal das células. O sistema por nós construído pode ser utilizado em outros experimentos onde se deseja estimular uma célula ou tecido por um campo conhecido em várias direções.

EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

Em nossos experimentos, estimulamos miócitos cardíacos de ratos em 12 direções de estimulação e observamos que o campo elétrico limiar, E_L, depende fortemente ($P<0,001$) de θ, ângulo entre a direção de estimulação e o eixo maior da célula (figura 6.7). Constatamos que o limiar transversal (limiar estimulatório obtido na direção transversal) é sempre maior que em qualquer direção (tabela 6.2), sendo aproximadamente o dobro do limiar longitudinal ($2,28 \pm 0,07$ V/cm). Este último corresponde ao menor limiar estimulatório (figura 6.8). Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos realizados em células isoladas de cobaia (Bardou et al., 1990; Tung et al., 1991), cão (Ranjan e Thakor, 1995) e rato (Gomes, 1997).

Para as direções longitudinal e transversal, foram construídas curvas de intensidade *vs.* duração do estímulo (curvas I *vs.* d) para caracterizar a preparação biológica. Foi observado que para todas as durações medidas (2, 5, 10 e 20 ms), o limiar transversal era aproximadamente o dobro do limiar longitudinal (figura 6.9). Os dados foram melhor ajustados pela equação de Weiss-Lapicque (capítulo 3, seção 3.5) que possui uma concavidade de subida mais suave que a curva obtida pela equação de Lapicque-Hill. O valor reobase (I_{rh}, corrente estimulatória para pulsos com duração infinita) longitudinal difere ($p<0,001$) de I_{rh} transversal. Os valores das cronaxias (~1,5 ms), duração para duas vezes I_{rh}, não foram afetados pela direção do pulso. Este resultado parece razoável considerando-se que a cronaxia corresponde à constante de tempo da membrana τ (Lapicque, 1926; Fozzard e Schoenberg, 1972; Pearce et al., 1982). Não há indicações que τ varie em diferentes regiões da célula. Experimentos realizados em cobaia (Tung et al.,1991) e em agregados de células (Jones et al., 1987) reportaram valores semelhantes aos nossos.

A diferença entre os limiares transversal e longitudinal pode ser explicada pelo modelo eletromagnético (capítulo 5, seção 5.2) que prevê que o potencial transmembrana induzido pelo campo elétrico externo depende da geometria e é maior quanto maior for a projeção do comprimento da célula ao longo da direção de aplicação do campo (Klee e Plonsey, 1976; Tung et al.,1991 e Knisley et al., 1993). Esta projeção diminui quando a direção do campo tende para a transversal ao eixo maior da célula, acarretando um maior E_L para que seja atingido o potencial transmembrana limiar (V_L, despolarização local da membrana) necessário para excitação.

Pode-se prever com o modelo que o campo limiar longitudinal de ~2,3 V/cm seja capaz de excitar uma célula por meio da indução de uma despolarização de 14,3 mV, que é

próximo ao valor encontrado na literatura para excitar o miocárdio (~18 mV) (Kishida et al., 1979).

A variação do limiar de estimulação tem implicação significante nos métodos desfibrilatórios. Nossos resultados mostram que a estimulação unidirecional pode ter diferentes efeitos nas fibras cardíacas, dependendo da sua orientação. Se, no coração inteiro estas propriedades forem aplicáveis, dois choques (estímulos) aplicados ortogonalmente, podem ser mais eficazes que o método convencional no processo desfibrilatório. Deve ser observado que o intervalo entre aplicação desses choques deveria ser inferior ao período refratário das células cardíacas ventriculares, assim as células estimuladas pelo primeiro pulso estariam refratárias quando o segundo fosse disparado, evitando a reincidência da perda de ritmo cardíaco ocasionada pela desfibrilação.

Identificamos uma região da célula ($-30° \leq \theta \leq 30°$) onde o limiar é mínimo e varia apenas 10% em relação ao limiar longitudinal, região esta que engloba as extremidades das células. Recentemente, experimentos realizados em cães (Saffitz et al., 1995) mostraram que há um número maior de junções *gap* nas extremidades das células. As junções *gap* são estruturas que formam um caminho de baixa resistência entre células e permitem um acoplamento elétrico e metabólico pela passagem de íons e pequenas moléculas por meio da conexão direta entre os citoplasmas de células vizinhas (Bers, 1991; Verheule et al., 1997). Em células isoladas, contudo, estes canais são fechados, não deixando razão para que o baixo valor de E_L fosse consequência de aumento de condutância da membrana celular.

É nossa opinião que a despolariazação local seja primariamente dependente da geometria e das dimensãoes celulares. Não podemos descartar, contudo a possibilidade de que

as junções *gap* sejam "ativadas" pelo campo elétrico externo e deste modo permitam fluxos iônicos despolarizantes.

A possibilidade de distribuição não homogêneas de canais de sódio (com maior concentração nas extremidades), não tem, até o momento, suporte na literatura para miócitos cárdiacos.

Como proposto pelo modelo eletromagnético (Klee e Plonsey, 1976) (capítulo 5) e demonstrado experimentalmente por Knisley et al (1993), a estimulação por campo induz o surgimento de um potencial transmembrana não uniforme na superfície da célula, gerando despolarização próxima ao catodo (-) e hiperpolarização próxima ao anodo (+) (figura 5.1). Em nossos experimentos, a estimulação das células foi efetuada por meio da aplicação de pulsos bipolares de corrente (figura 3.7B). A primeira fase pode ser interpretada como um estímulo condicionante (e sublimiar) para excitação ocorrida propriamente na segunda fase. Durante a primeira fase ocorre a ativação de corrente de sódio (I_{Na}) no lado despolarizado e ativação de corrente de entrada de potássio (I_{K1}) no lado hiperpolarizado, na segunda fase (onde limiar de excitação é alcançado) há ativação de I_{Na} no lado despolarizado e ativação de I_{K1} no lado hiperpolarizado. Deste modo, as duas fases agem sinergicamente de modo a diminuir o limiar de excitação (Jones et al., 1987; Tung e Borderies, 1992) e difere do encontrado se os pulsos forem monopolares (figura 3.7A) com duração igual a uma das fases do pulso bipolar.

A entrada de íons potássio tenderia a hiperpolarizar a célula se esta quantidade fosse suficiente para fazer com que a concentração interna de K^+ se alterasse significativamente a ponto de contrabalançar a mudança do campo elétrico através da membrana causada pelo influxo do íon (*charge screening*). Neste caso, o íon, antes de ter um efeito marcante sobre o

potencial de equilíbrio, se acumularia nas vizinhanças da membrana interna levando a uma despolarização.

Para pulsos monopolares, I_{Na} é originada no lado despolarizado e I_{K1} (corrente de entrada) no lado hiperpolarizado. Constatamos, em nossos experimentos, uma redução de ~25% do limiar (transversal ou longitudinal) quando comparamos a aplicação de pulsos bipolares com pulsos monopolares (figura 6.10).

Todavia, Tung e Borderies (1992), por meio de simulação, observaram que os limiares alcançados por pulsos monopolares e pulsos bipolares, com duração total igual ao do pulso monopolar, são similares. Neste caso, o limiar para pulsos bipolares aumentou porque o tempo disponível para entrada de I_{Na} foi reduzido à metade.

Para uma mesma direção de estimulação, observamos que não houve diferença estatística quando estimulamos a célula nos dois sentidos (polaridades), ou seja, a inversão de polaridade não afetou o limiar de estimulação (figura 6.10) tanto para pulsos monopolares quanto bipolares. Este resultado também foi observado em células isoladas de cães (Frazier et al., 1988) e de coelho (Knisley et al, 1993) e em agregados de células (Jones et al. 1987). Além do modelo eletromagnético não prever diferença para V_L calculados em ângulos cuja diferença é 180° (equação 5.7), as células estudadas apresentaram bastante simetria com relação ao eixo transversal sob o ponto de vista geométrico.

Ranjan e Thakor (1995) realizaram experimentos em células isoladas de cães e observaram diferença estatística entre os limiares obtidos nas duas polaridades. A definição de polaridade com base no valor obtido (maior E_L definido como uma das polaridades) pode ser a causa da discordância dos resultados daqueles autores com os nossos resultados.

CONCLUSÕES

Em nosso trabalho, projetamos e construímos um sistema para geração de campo elétrico uniforme **E** em 12 sentidos numa câmara de estimulação de miócitos ventriculares isolados de rato. O modelo eletromagnético proposto por Klee e Plonsey (1976) foi testado para uma ampla variação de θ (ângulo entre **E** e o eixo maior da célula). A concordância entre o experimento e a teoria foi satisfatória indicando que o modelo pode contribuir para o entendimento do comportamento de miócitos isolados submetidos a um campo elétrico externo.

A idéia, já colocada em prática por outros autores, de estimulação com eletrodos posicionados ortogonalmente , encontra apoio nos nosso dados experimentais. Se dois pulsos defazados por um período menor que o período refratário das células ventriculares forem aplicados sequencial e ortogonalmente ao coração, as células alinhadas aos campos seriam ativadas. Como para a desfibrilação é necessário ativar o maior número possível de células e como a orientação das células pode ser considerada "aleatória", ambos pares de eletrodos "veriam" células alinhadas com o campo elétrico por eles produzidos. Neste caso, com um campo médio de menor intensidade em cada par de eletrodos, mais células seriam ativadas, aumentando a chance de sucesso na desfibrilação ou pelo menos mantendo a mesma eficiência com menor chance de lesão celular.

APÊNDICE I

CÁLCULO DO CAMPO E POTENCIAL ELÉTRICOS EM TORNO DE DOIS FIOS INFINITOS NO VÁCUO

Inicialmente, calculamos o campo elétrico $\mathbf{E}_a$ em torno de apenas um fio infinito com carga q no vácuo. Tomamos uma superfície gausssiana cilíndrica Σ (vide figura A1.1) que envolve todo o fio e sobre ela aplicamos a Lei de Gauss (equação A1.1).

$$\oint_{\Sigma} \vec{E}_a \bullet \hat{n} dA = \frac{q}{\varepsilon_0} \qquad \text{eq. A1.1}$$

onde **n** e A são, respectivamente, a normal e a área da superfície gaussiana Σ e ε_0 é a permissividade do vácuo.

Resolvendo a equação A1.1, em coordenadas cilíndricas, obtivemos a expressão para o campo elétrico $\mathbf{E}_a$ em torno de um fio infinito com densidade linear de carga $\rho \left(\rho = \frac{q}{\ell} \right)$ no vácuo e observamos que só existe campo elétrico na direção radial (equação A1.2).

$$\vec{E}_a = \frac{1}{2\pi r \varepsilon_0} \rho \hat{a}_r \qquad \text{eq. A1.2}$$

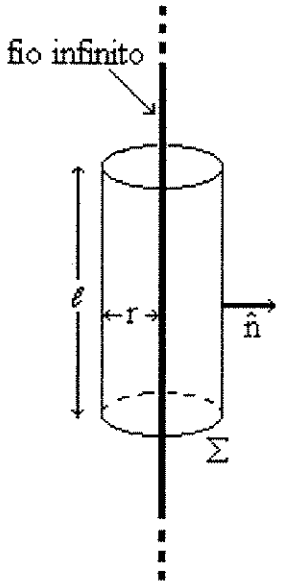


Figura A1.1 – Fio infinito envolvido por uma superfície gaussiana Σ de raio r e comprimento ℓ, no vácuo.

Utilizando coordenadas cartesianas, o campo elétrico resultante produzido por dois fios infinitos (densidade de carga $+\rho$ e $-\rho$ separados por um distância 2b no vácuo) num ponto arbitrário P(x,y,0) é a soma do campo $\mathbf{E}_+$ produzido pelo fio com densidade $+\rho$ com o campo $\mathbf{E}_-$ produzido pelo fio com densidade $-\rho$ (figura A1.2). Não perdemos a generalidade escolhendo o ponto P em z=0 porque só existe campo no plano xy (equação A1.2).

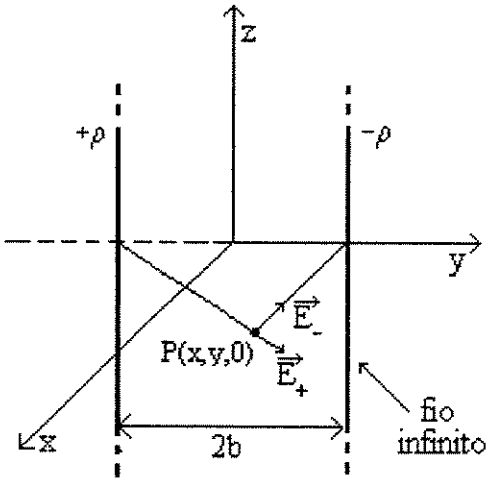


Figura A1.2 – Posicionamento dos dois fios infinitos no eixo cartesiano e representação dos campos elétricos (E_+ e E_-) produzidos por cada dos fios num ponto P(x,y,0).

A equação A1.3 descreve $\mathbf{E}_+$ que foi calculado a partir da equação A1.2 onde o versor $\mathbf{a}_r$ foi substituído pelo versor $\mathbf{e}_+$ (vetor unitário que define a direção do campo $\mathbf{E}_+$). O mesmo raciocínio foi utilizado ao descrevermos $\mathbf{E}_-$(eq. A1.4) onde substituímos o vesor $\mathbf{a}_r$ por $\mathbf{e}_-$ (vetor unitário que define a direção do campo $\mathbf{E}_-$) (figura A1.3).

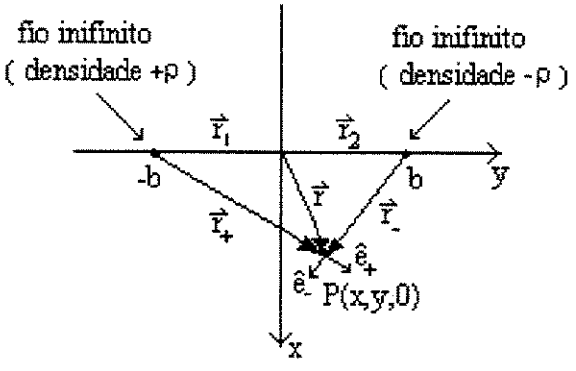


Figura A1.3 – Representação dos fios infinitos no plano xy onde estão indicadas as distâncias ao ponto P.

$$\vec{E}_+ = \frac{\rho}{2\pi\varepsilon_0}\frac{1}{|\vec{r}_+|}\hat{e}_+ \qquad \text{eq. A1.3}$$

$$\vec{E}_- = -\frac{\rho}{2\pi\varepsilon_0}\frac{1}{|\vec{r}_-|}\hat{e}_- \qquad \text{eq A1.4}$$

onde $\mathbf{r} = x\mathbf{a}_x + y\mathbf{a}_y$

$\mathbf{r}_1 = -b\mathbf{a}_y$

$\mathbf{r}_2 = +b\mathbf{a}_y$

$\mathbf{r}_+ = \mathbf{r} - \mathbf{r}_1 = x\mathbf{a}_x + (y+b)\mathbf{a}_y$

$|\mathbf{r}_+| = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_1| = \sqrt{x^2 + (y+b)^2}$ = distância entre o ponto P e o fio com densidade $+\rho$

$\mathbf{r}_- = \mathbf{r} - \mathbf{r}_2 = x\mathbf{a}_x + (y-b)\mathbf{a}_y$

$|\mathbf{r}_-| = |\mathbf{r} - \mathbf{r}_2| = \sqrt{x^2 + (y-b)^2}$ = distância entre o ponto P e o fio com densidade $-\rho$

$$e_+ = \frac{\vec{r} - \vec{r}_1}{|\vec{r} - \vec{r}_1|} = \frac{x\hat{a}_x + (y+b)\hat{a}_y}{\sqrt{x^2 + (y+b)^2}}$$

$$e_- = \frac{\vec{r} - \vec{r}_2}{|\vec{r} - \vec{r}_2|} = \frac{x\hat{a}_x + (y-b)\hat{a}_y}{\sqrt{x^2 + (y-b)^2}}$$

Finalmente, somando $\mathbf{E}_+$ e $\mathbf{E}_-$ (equações A1.3 e A1.4, respectivamente) obtivemos o campo $\mathbf{E}_1$ em torno de dois fios infinitos paralelos com densidade $+\rho$ e $-\rho$ distantes de 2b no vácuo (eq. A1.5).

$$\vec{E}_1(x,y) = \frac{\rho b}{\pi\varepsilon_0}\left\{\frac{1}{[x^2 + (y+b)^2][x^2 + (y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x + (x^2 - y^2 + b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq. A1.5}$$

Também é de nosso interesse sabermos o potencial elétrico ϕ em torno daqueles fios. Para isso, inicialmente, calculamos o potencial elétrico $d\phi$ (equação A1.9) produzido por um par de cargas lineares dq_+ e dq_- (correspondentes aos fios com densidade $+\phi$ e $-\phi$, respectivamente) no ponto P(x,y,0) (figura A1.4). Não perdemos a generalidade escolhendo um ponto no plano xy , pois as cargas lineares se estendem ao longo da mesma distância acima e abaixo do plano.

$$d\phi = \frac{dq_+}{4\pi\varepsilon_0}\frac{1}{|\vec{r}'_+|} + \frac{dq_-}{4\pi\varepsilon_0}\frac{1}{|\vec{r}'_-|} \qquad \text{eq.A1.6}$$

onde $dq_+ = +\rho dz$ e $dq_- = -\rho dz$ eq. A1.7

$$|\vec{r}_+'| = \sqrt{z^2 + |\vec{r}_+|^2} \quad \text{e} \quad |\vec{r}_-'| = \sqrt{z^2 + |\vec{r}_-|^2} \qquad \text{eq. A1.8}$$

$$|\vec{r}_+| = \sqrt{x^2 + (y+b)^2} \quad \text{e} \quad |\vec{r}_-| = \sqrt{x^2 + (y-b)^2} \qquad \text{eq. A1.9}$$

Substituindo as equações A1.7 e A1.8 na equação A1.6, obtivemos a equação que descreve o $d\phi$ no ponto P.

$$d\phi = \frac{\rho dz}{4\pi\varepsilon_0}\left(\frac{1}{\sqrt{z^2 + |\vec{r}_+|^2}} + \frac{1}{\sqrt{z^2 + |\vec{r}_-|^2}}\right) \qquad \text{eq. A1.10}$$

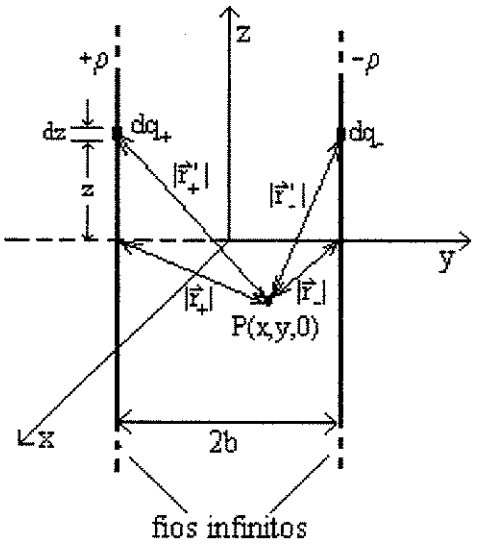


Figura A1.4 –Representação das distâncias dos diferenciais de carga dq_+ e dq_- ao ponto P(x,y,0) onde foi calculado o potencial elétrico $d\phi$.

Aproveitando a simetria em relação ao eixo z, podemos descrever o potencial elétrico ϕ (soma de todos os $d\phi$) produzido pelos fios pela equação A1.10.

$$\phi = \int_{-\infty}^{\infty} d\phi = 2\int_{0}^{\infty} d\phi \qquad \text{eq A1.11}$$

Substituindo as equações A1.9 e A1.10 na equação A1.11, temos o potencial elétrico ϕ em torno de dois fios infinitos paralelos com densidades $+\rho$ e $-\rho$ distantes de 2b no vácuo é dado pelo limite da equação A1.11 (equação A1.12).

$$\phi = -\frac{\rho}{2\pi\varepsilon_0} \ln \frac{\sqrt{x^2 + (y+b)^2}}{\sqrt{x^2 + (y-b)^2}} \qquad \text{eq. A1.12}$$

APÊNDICE II

DETERMINAÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO EM r = b

Em nossos cálculos necessitamos saber o comportamento de E em r=b, antes do posicionamento de uma casca cilíndrica dielétrica. Para isso, convertemos o campo já descrito em coordenadas cartesianas (x,y,z) (equação 4.9) para coordenadas cilíndricas (r, φ,z) que é mais adequada para descrever o campo em r=b.

$$\vec{E}_3(x,y)=\frac{b}{\pi\sigma}\left(\frac{I_3}{h}\right)\left\{\frac{1}{[x^2+(y+b)^2][x^2+(y-b)^2]}\right\}\left[(-2xy)\hat{a}_x+(x^2-y^2+b^2)\hat{a}_y\right] \qquad \text{eq. 4.9}$$

A mudança de coordenadas foi realizada usando-se as equações abaixo (Paris e Hurd, 1984) (figura A2.1):

$x = r\cos\varphi$

$y = r\,\mathrm{sen}\varphi$

$z = z$

$\mathbf{a}_x = \cos\varphi\,\mathbf{a}_r - \mathrm{sen}\varphi\,\mathbf{a}_\varphi$

$\mathbf{a}_y = \mathrm{sen}\varphi\,\mathbf{a}_r + \cos\varphi\,\mathbf{a}_\varphi$

$\mathbf{a}_z = \mathbf{a}_z$

Após as devidas substituições, obtivemos a equação do campo em coordenadas cilíndricas (equação A2.1).

$$\vec{E} = \frac{\rho b}{\pi\varepsilon_0}\left[\frac{1}{(r^2 + b^2 + 2rb\,\mathrm{sen}\,\varphi)(r^2 + b^2 - 2rb\,\mathrm{sen}\,\varphi)}\right]\left[(b^2 - r^2)\,\mathrm{sen}\,\varphi\hat{a}_r + (b^2 + r^2)\cos\varphi\hat{a}_\varphi\right]$$

eq. A2.1

Observamos, claramente, que para r=b não há componente do campo na direção radial ($\mathbf{a}_r$), ou seja, só existe campo na direção tangencial ($\mathbf{a}_\varphi$) à circunferência de raio b (figura A2.1).

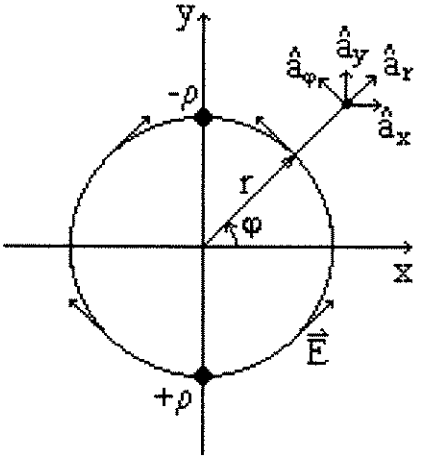


Figura A2.1 – Desenho esquemático das linhas de campo de **E** em r=b. No canto direito superior são ilustrados os versores cartesianos e cilíndricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARDOU AL, CHENAIS JM, BIRKUI PJ, GOVAERE MC, AUGER PM, VON EUW D, DEGONGE J: Directional variability of stimulation threshold measurements in isolated guinea pig cardiomyocytes: Relationship with orthogonal sequential defibrillating pulses. *PACE*; **13**: 1590-1595, 1990.

BARDOU AL, DEGONGE J, BIRKUI PJ, AUGER P, CHENAIS JM, DURIEZ M: Reduction of energy required to defibrillation by delivering shocks in orthogonal directions in the dog. *PACE*; **11**: 1990-1995, 1988.

BERS DM: Excitation-Contraction coupling and cardiac contractile force. 1ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. v122 (Developments in cardiovascular medicine), p. 1-15.

BASSANI RA, BASSANI JWM, BERS DM: Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduced $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol*; **453**: 591-608, 1993.

BENEDEK GB, VILLARS FMH: Physics with illustrative examples from medicine and biology. Massachusetts: Addisson-Wesley Publishing Company, 1979. v3 (Electricity and Magnetism), p. 2-1-2-43, 2-160-2-185, 3-60-3-105.

BERNE RM, LEVY MN: Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

FOZZARD HA, SCHOENBERG M: Strength-duration curves in cardiac Purkinje fibers: Effects of liminal length and charge distribution . *J. Physiol.* (Lond); **226**: 593-618, 1972.

FRAZIER DW, KRASSOWSKA W, CHEN PS, WOLF PD, DIXON EG, SMITH WM, IDEKER RE: Extracellular field required for excitation in three-dimensional anisotropic canine myocardium. *Circ Res*; **63**: 147-164, 1988

GEDDES LA, BOURLAND JD: Tissue stimulation: Theoretical considerations and practical applications. *Med Biol Comput*; **23**: 131-137, 1985

GOMES PAP: Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: Medição de $[Ca^{2+}]$ e limiar de estimulação. Campinas, 1997. 163p. Tese (Doutorado) – UNICAMP.

GURNEY RW: Ionic Process in solution. New York: Dover Publication, 1962. p. 38-46, 58-62.

HORVATH AL: Handbook of Aqueous Electrolyte solutions- Physical properties estimation and correlation methods. Chichester: Ellis Horwood Limited Publishers, 1985

JONES JL, JONES RE, BALASKY G: Improved cardiac cell excitation with simmetrical biphasic defibrillator waveform. *Am J Physiol*; **253**: H1418-H1424, 1987.

JONES DJ, KLEIN GJ, GUIRAUDON GM, SHARMA AD: Sequential pulse defibrilation in humans: Orthogonal sequential pulse defibrilation with epicardial electrodes. *J Am Coll Cardiol*; **11**: 590-596, 1988.

JELTSCH E, ZIMMERMMAN Z: Particles in homogeneous electrical field: A model for the electric breakdown of living cells in a Coulter counter. *Bioeletrochem Bioenerg*, **6**: 349-384, 1979.

KISHIDA H, SURAWICZ B, FU LT: Effect of K^+ and K^+-induced polarization on $(dV/dt)_{max}$, threshold potential, and membrane input resistance in guinea pig and cat ventricular myocardium. *Circ Res*; **44**: 800-814, 1979.

KLEE M, PLONSEY R: Stimulation of spheroidal cells: The role of cell shape. *IEEE Trans Biomed Eng*; **BME-23**: 347-354, 1976.

KNISLEY SB, BLITCHINGTON TF, HILL BC, GRANT AO, SMITH WM, PILKINGTON TC, IDEKER RE: Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. *Circ Res*; **72**: 255-270, 1993.

KRASSOWSKA W, NEU JC: Response of a single cell to an external electric field. *Biophys J*; **66**: 1768-1776, .

KRASSOWSKA W, PILKINGTON TC, IDEKER RE: Periodic conductivity as a mechanism for cardiac stimulation and defibrillation. *IEEE Trans Biomed Eng*; **34**: 555-560, 1987.

LAPICQUE L: Léxcitabilte en function du temps. Paris: Presses Universitaires de France, 1926. Apud GEDDES LA, BOURLAND JD: Tissue stimulation: Theoretical considerations and practical applications. *Med Biol Comput*; **23**: 131-137, 1985.

LOBO VMM: Handbook of electrolyte solutions – Physical Science data 41. New York: Elsevier Science Publishers, 1989.

NOBLE D: The relation of Rushton's 'liminal length' for excitation to the resting and active conductances of excitable cells. *J Physiol*; **226**: 573-590, 1972.

OSAKA T, KODAMA I, TSUBOI N, TOYAMA J, YAMADA K: Effects of activation sequence and anisotropic cellular geometry on the repolarization phase of action potential of dog ventricular muscles. *Circulation*; **76 (1)**, 226-236, 1987.

PALMER WG: Experimental physical chemistry. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1962. p.179-192.

PARIS DT, HURD FK: Teoria eletromagnética básica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara dois, 1984. p. 97-144.

PEARCE JA, BOURLAND JD, NIELSEN W,GEDDES LA. VOELZ M: Myocardial stimulation with ultrashort duration current pulses. *PACE*; **5**: 52-58, 1982.

PLONSEY R, FLEMING D: Bioelectric phenomena. New York McGraw Hill, 1969.p-202-275.

ROBERTS DE, HERSH LT, SCHER AM: Influence of cardiac fiber orientation on wavefront voltage, conduction velocity, and tissue resistivity. *Cir. Res* **44**: 701-712, 1979.

RANJAN R, THAKOR NV: Electrical stimulation of cardiac myocytes. *Ann Biomed Eng*; **23**: 812-821, 1995.

SAFFITZ JE, DAVIS LD, DARROW BJ, KANTER HL, LAING JD, BEYER EC: The molecular basis of anisotropy: Role of gap junction. *J Cardiovasc Electrophysiol*; **6**:498-510, 1995.

SCHEMENTSCHENKO WK, SERPINSKII : Electric conductance of electrolyte mixtures. Zh Obahch Khim 1933; 3:470. Apud LOBO VMM. Handbook of electrolyte solutions – Physical Science data 41. New York: Elsevier Science Publishers, 1989.

TUNG L, BORDERIES J-R: Analysis of electric field stimulation of single cardiac muscle cells. *Biophys J*; **63**: 371-386, 1992.

TUNG L, SLIZ N, MULLIGAN MR: Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circ Res*; **68**: 1501-1526, 1991.

VERHEULE S, VAN KEMPER MJA, TE WELSCHER PHJA, KWAK BR, JONGSMA HJ: Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*; **80**: 673-681, 1997.