



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação**  
**Departamento de Engenharia Biomédica**

**Estimulação multidirecional de células cardíacas:  
instrumentação e experimentação**

**Autor:** Alexandra Valenzuela Santelices da Fonseca

**Orientador:** Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Almada Bassani

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

Campinas, dezembro de 2009.



**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação**  
**Departamento de Engenharia Biomédica**

**Estimulação multidirecional de células cardíacas:  
instrumentação e experimentação**

**Autor:** Alexandra Valenzuela Santelices da Fonseca

**Orientador:** Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

**Co-Orientadora:** Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Almada Bassani

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

Comissão Examinadora:  
Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani  
Prof. Dr. Wilson Nadruz Júnior  
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa

Campinas, dezembro de 2009.

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

F733e Fonseca, Alexandra Valenzuela Santelices  
Estimulação multidirecional de células cardíacas:  
instrumentação e experimentação / Alexandra  
Valenzuela Santelices da Fonseca. --Campinas, SP:  
[s.n.], 2009.

Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani,  
Rosana Almada Bassani.

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

1. Desfibriladores. 2. Miócitos cardíacos. 3.  
Estimulação cardíaca artificial. 4. Campos elétricos. 5.  
Fibrilação ventricular. I. Bassani, José Wilson  
Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Multidirectional stimulation of cardiac cells: instrumentation  
and experimentation

Palavras-chave em Inglês: Defibrillation, Cardiac myocyte, Electric stimulation,  
Cardiac pacing, Electric fields

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Wilson Nadruz Júnior, Eduardo Tavares Costa

Data da defesa: 03/12/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

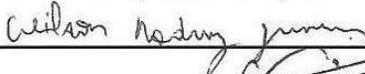
## COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

**Candidata:** Alexandra Valenzuela Santelices da Fonseca

**Data da Defesa:** 3 de dezembro de 2009

**Título da Tese:** "Estimulação Multidirecional de Células Cardíacas: Instrumentação e Experimentação"

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (Presidente): \_\_\_\_\_ 

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa:  \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Profs. José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani por me orientarem de maneira tão efetiva, me proporcionarem um grande aprendizado e por acreditarem em mim.

Aos outros professores do Departamento de Engenharia Biomédica.

Aos funcionários e estagiários do Departamento de Engenharia Biomédica e Centro de Engenharia Biomédica, em especial às secretárias Adriana Chaves Cavalcanti de Andrade e Nirlei Aparecida Vitareli Souza, ao engenheiro Sérgio Paulo Moura e aos técnicos Eugênio Carlos Carrara, Mauro Sérgio Martinazzo e Carlos Alberto Lourenço da Silva pelo apoio técnico e à bióloga Elizângela Souto de Oliveira pelo preparo de miócitos e soluções fisiológicas.

Aos alunos e ex-alunos do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial àqueles que me ajudaram de forma mais direta com sugestões e troca de experiências: Pedro Xavier de Oliveira, Rafael de Almeida Ricardo, Mariana Zacchi Vilela, Diogo Coutinho Soriano, Marina Carneiro Monteiro, João Loures Salinet Jr. e Mariana Sacrini Ayres Ferraz.

Aos meus queridos amigos pelos conselhos, companheirismo e paciência.

À minha família, cujo apoio, compreensão, incentivo, amor, carinho, paciência e dedicação foram essenciais para que tudo até aqui se concretizasse.

Enfim, a todos que de alguma forma me apoiaram e contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

E a Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O procedimento mais efetivo para reverter arritmias cardíacas consiste na aplicação de choques elétricos de alta intensidade, como é o caso da desfibrilação. Estimulação com campos elétricos ( $E$ ) elevados, entretanto, exerce efeitos deletérios sobre o músculo cardíaco, podendo causar disfunções elétrica e contrátil e até a morte celular. Privilegiar a estimulação na direção longitudinal, para qual o limiar de excitação das células cardíacas é menor, seria uma forma de se reduzir a amplitude do estímulo sem perder a efetividade da estimulação. Para isto, foi desenvolvido e testado, em miócitos ventriculares orientados de maneira aleatória, um sistema de estimulação multidirecional automática que permite o chaveamento controlado de estímulos seqüenciais para três diferentes pares de eletrodos (cada um correspondendo a uma direção) em um intervalo de tempo inferior à duração do potencial de ação (período em que a célula se encontra eletricamente refratária). A estimulação multidirecional com uma intensidade de  $E$  20% acima do limiar estimulatório ( $1,2 \times ETM$ ) dobrou o recrutamento (excitação) de células (80 vs. 40% com estimulação unidirecional,  $p < 0,001$ ). Adicionalmente, o recrutamento com a estimulação multidirecional automática foi maior ( $p < 0,001$ ) do que a soma dos recrutamentos obtidos com a estimulação em cada direção individualmente (sem intersecção), o que sugere que a estimulação sublimiar durante o procedimento automático pode aumentar a excitabilidade celular. Foi observado também que, para uma dada amplitude do estímulo, o uso da forma de onda bipolar (para a qual o valor de  $E_{TM}$  foi menor que para pulsos monopulares:  $3,2 \pm 0,1$  vs.  $3,9 \pm 0,1$  V/cm;  $p < 0,001$ ) promoveu um recrutamento maior do que com o pulso monopolar (recrutamento de 50% das células foi obtido com  $2,97 \pm 0,04$  e  $4,18 \pm 0,05$  V/cm para pulsos bipolares e monopulares, respectivamente;  $p < 0,05$ ). A combinação da estimulação multidirecional automática com o uso da forma de onda bipolar permitiu, portanto, uma redução de cerca de 50% no valor do  $E$  absoluto (3,8 vs. 7,8 V/cm com estimulação unidirecional e pulso monopolar) para um recrutamento de ~80% das células. A aplicação destes procedimentos na estimulação cardíaca (marcapasso e desfibrilação) pode otimizar o processo, levando a uma melhor eficiência e uma menor incidência de lesão.

## ABSTRACT

The most effective procedure to revert cardiac arrhythmias consists in the application of high intensity electric discharge, such as in cardiac defibrillation. Nevertheless, stimulation using high electric fields ( $E$ ) may cause injury to the cardiac muscle, generating electric and contractile dysfunctions and even cell death. A possible way to reduce the stimulus intensity while maintaining the stimulation effectiveness would be stimulate cardiac cells with  $E$  applied parallel to the cell major axis, in which case the stimulation threshold is lower. To test this possibility, a multidirectional stimulation system was developed and tested on randomly-oriented rat ventricular myocytes. The system allows the controlled switching of sequential stimuli delivered to three different pairs of electrodes (each one corresponding to one direction), in a period shorter than the action potential duration (when cell is electrically refractory). The multidirectional stimulation with  $E$  intensity 20% above the stimulation threshold ( $1.2 \times \text{ETM}$ ) doubled the percentage of recruited (excited) cells ( $\sim 80$  vs.  $\sim 40$  % with unidirectional stimulation,  $p < 0.001$ ). Additionally, recruitment with automatic multidirectional stimulation was greater ( $p < 0.001$ ) than the sum of recruitments obtained from stimulation of each direction individually (without intersection), which is suggestive that subthreshold stimulation during the automatic procedure might enhance cell excitability. Moreover, it was observed that for a given absolute stimulus amplitude, the use of biphasic waveforms (for which ETM was lower than for monophasic pulses:  $3.2 \pm 0.1$  vs.  $3.9 \pm 0.1$  V/cm;  $p < 0.001$ ) promoted higher recruitment than monophasic stimuli (50% recruitment was attained with  $2.97 \pm 0.04$  and  $4.18 \pm 0.05$  V/cm with biphasic and monophasic pulses, respectively;  $p < 0.05$ ). Thus, the association of automatic multidirectional stimulation and biphasic waveform enabled a 50% reduction of the absolute  $E$  value (3.8 vs. 7.8 V/cm with unidirectional stimulation and monopolar pulse) to evoke excitation in  $\sim 80\%$  of the cells. The application of these procedures to cardiac stimulation (pacemaker and defibrillation) might optimize the process, leading to greater efficiency and lower injury incidence.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS</b> .....	08
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	09
3.1 MIÓCITOS VENTRICULARES .....	09
3.1.1 Animais .....	09
3.1.2 Soluções fisiológicas .....	09
3.1.3 Isolamento das células .....	10
3.2 DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS .....	10
3.2.1 Câmara de estimulação .....	10
3.2.2 Estimulador elétrico para estimulação manual .....	11
3.2.3 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos monopolares .....	13
3.2.3.1 <i>Circuito de chaveamento</i> .....	13
3.2.3.2 <i>Controle do chaveamento</i> .....	16
3.2.4 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos bipolares .....	18
3.2.4.1 <i>Circuito de chaveamento</i> .....	18
3.2.4.2 <i>Circuito de controle</i> .....	19
3.2.5 Osciloscópio .....	22
3.2.6 Sistema de microscopia .....	22
3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	24
3.3.1 Manipulação das células .....	24
3.3.2 Estimulação das células por campo elétrico .....	24
3.3.2.1 <i>Estimulação multidirecional manual</i> .....	25
3.3.2.2 <i>Estimulação multidirecional automática</i> .....	27
3.3.3 Estimativa do campo elétrico no interior da câmara de estimulação .....	28
3.3.4 Análise estatística dos dados .....	29
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS</b> .....	30
4.1 SISTEMAS DE ESTIMULAÇÃO MULTIDIRECIONAL .....	30

---

4.1.1 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulso monopolar .....	30
4.1.2 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulso bipolar .....	32
4.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE POPULAÇÕES DE MIÓCITOS .....	36
4.2.1 Estimulação uni e multidirecional com pulso monopolar .....	36
4.2.1.1 Estimulação multidirecional manual .....	36
4.2.1.2 Estimulação multidirecional automática .....	39
4.2.2 Estimulação uni e multidirecional com pulso bipolar .....	41
4.2.2.1 Estimulação multidirecional manual .....	41
4.2.2.2 Estimulação multidirecional automática.....	44
4.2.3 Pulso monopolar × pulso bipolar .....	45
<b>CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1 SISTEMAS DE ESTIMULAÇÃO MULTIDIRECIONAL AUTOMÁTICA .....	50
5.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE POPULAÇÕES DE MIÓCITOS .....	51
5.2.1 Recrutamento × amplitude do estímulo .....	51
5.2.2 Recrutamento × direção .....	52
5.2.3 Recrutamento × forma de onda .....	55
5.2.4 Implicações clínicas .....	56
<b>CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO – PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Orientação das fibras musculares ventriculares: três grupos de fibras em arranjo espiral formam os dois ventrículos, e um outro grupo compõe apenas a estrutura muscular do ventrículo esquerdo (Malmivuo & Plonsey, 1995). ..... 02

Figura 1.2 – Registro da variação do potencial de membrana ( $V_m$ ) em função do tempo durante um potencial de ação (PA) típico em um miócito ventricular de mamífero. Os Algarismos indicam as fases do PA: fase 0 de despolarização rápida, fase 1 de repolarização inicial, fase 2 de platô, fase 3 de repolarização final e fase 4 de diástole elétrica. Modificado de Bers (2001). ..... 03

Figura 1.3 – Campo limiar excitatório ( $E_T$ ) em função da orientação (em graus) da direção de aplicação do estímulo em relação ao eixo maior da célula. Quando esta direção é perpendicular,  $E_T$  é o dobro do valor medido na mesma célula quando a direção do estímulo é paralela ao eixo maior da célula. Os pontos são os valores médios e as barras verticais indicam o intervalo de confiança para 95% (Bassani *et al.*, 2006). ..... 07

Figura 3.1 – Vista explodida da câmara de estimulação cujo raio da base mede 10 mm (Lima, 1999). ..... 12

Figura 3.2 – Esquema do sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos monopares. Os pulsos de controle determinam o tempo, da ordem de milissegundos, em que os interruptores conduzem. Os interruptores estão conectados aos pares de eletrodos da câmara de estimulação, a qual está ilustrada à direita. ..... 13

Figura 3.3 – Circuito de chaveamento correspondente à direção  $0^\circ$ . ..... 14

Figura 3.4 – Circuito de chaveamento completo conectado à câmara de estimulação. .... 15

- Figura 3.5 – Diagrama de blocos. O fluxo de dados e a ordem de execução dos comandos ocorrem da esquerda para a direita no painel de programação, de forma seqüencial, e estão determinados pelas operações ou funções que processam os dados. .... 17
- Figura 3.6 – Painel frontal com controles numéricos e o indicador gráfico. .... 18
- Figura 3.7 – Esquema da conexão dos interruptores do sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos bipolares. .... 19
- Figura 3.8 – Circuito de chaveamento correspondente à direção 0° para a geração de pulsos bipolares através de dois relés. .... 20
- Figura 3.9 – Seis pulsos de controle monopulares na saída do PIC geram três pulsos estimulatórios bipolares na saída dos relés. .... 21
- Figura 3.10 – Estimulador elétrico multidirecional desenvolvido no CEB que permite selecionar a forma de onda (pulsos retangulares de tensão mono e bipolar). Possui três saídas (uma para cada direção de estimulação), um monitor de corrente e uma entrada para a fonte variável de tensão. .... 22
- Figura 3.11 – Montagem experimental usada para a execução da estimulação elétrica das células. A câmara de estimulação foi conectada ao estimulador e a imagem do campo microscópico foi captada pela câmera de vídeo e mostrada no monitor de vídeo. Com o osciloscópio ligado ao estimulador, fez-se o monitoramento dos estímulos. .... 23
- Figura 3.12 – Miócitos presentes na área de trabalho da câmara de estimulação. As células que compõem a população a ser estudada estão marcadas em amarelo. As linhas vermelhas representam as três direções estabelecidas para a estimulação (0°, 60° e 120°). .... 25
- Figura 3.13 – Sinal de tensão, obtido por osciloscópio, sobre o par de eletrodos da direção 0°, durante aplicação do pulso monopolar com o estimulador fabricado no CEB. A escala de tensão é de 5 V/div. À esquerda, encontra-se o pulso com duração de 5 ms (intensidade arbitrária), numa escala de 5 ms/div, e à direita, a imagem em outra escala de tempo (200 ms/div) ilustrando a frequência de 0,5 Hz. .... 26

Figura 3.14 – Sinal de tensão, obtido por osciloscópio, sobre o par de eletrodos da direção  $0^\circ$ , durante aplicação do pulso bipolar com o estimulador fabricado no CEB. À esquerda, encontra-se o pulso com duração total de 10 ms (5 ms cada fase) e com intensidade arbitrária; e à direita, a imagem em outra escala ilustrando a frequência de 0,5 Hz. Mesmas escalas da Figura 3.13. .... 26

Figura 3.15 – Pulsos de controle da comutação dos relés enviados pelo LabView™ ao circuito de chaveamento. .... 27

Figura 4.1 – Pulsos de controle enviados pelo programa feito em Labview™ aos relés conectados aos pares de eletrodos das direções  $0^\circ$  (pulso à esquerda) e  $60^\circ$  (pulso à direita). Este último só se iniciava 5 ms após o término do primeiro pulso (direção  $0^\circ$ ). Escalas: 2 V/div e 5 ms/div. .... 31

Figura 4.2 – Tensão sobre o resistor de precisão de  $6,9\Omega$ . Os pulsos possuem amplitude de 690 mV ( $I = 100$  mA). Escalas: 500 mV/div e 5 ms/div. .... 31

Figura 4.3 – Tensão sobre o resistor de precisão em uma escala de tempo comprimida (500 ms/div). Cada deflexão do sinal, com intervalo de 2 s, corresponde ao trio de pulsos mostrado na Figura 4.2. .... 32

Figura 4.4 – Pulsos gerados pelo microcontrolador, com 5 V de amplitude e 5 ms de duração. (A) Portas RB0 e RB1: atraso de apenas 5 ms de um pulso para outro, para geração de um único pulso bipolar. (B) Portas RB0 e RB2: intervalo de 5 ms entre os pulsos que corresponde ao tempo de duração do pulso de RB1 (estes sinais correspondem à mesma fase de 2 pulsos bipolares sucessivos, a serem aplicados em direções diferentes). Os pulsos das portas RB3 a RB5 são gerados seqüencialmente no mesmo padrão. Escalas: 2 V/div e 5 ms/div. .... 33

Figura 4.5 – Sinal de tensão aplicada sobre o resistor de precisão de  $6,9 \Omega$ , com amplitude de 690 mV. Cada dois pulsos correspondem a um pulso bipolar numa dada direção de estimulação. O pulso correspondente à fase negativa do pulso bipolar gerado no par de eletrodos é aqui visto positivo devido à posição do resistor no circuito. Escalas: 500 mV/div e 5 ms/div. .... 34

Figura 4.6 – Pulsos bipolares aplicados à câmara em cada direção de estimulação. Na direção 0°, o tempo decorrido entre fases positiva e negativa do pulso é de 454,55  $\mu$ s; na direção 60°, o tempo é de 370,37  $\mu$ s; e na direção 120°, 925,93  $\mu$ s. Escalas: 20 V/div e 1 ms/div. .... 35

Figura 4.7 – Pulso bipolar sobre o par de eletrodos referente à direção 0°; frequência de 0,5 Hz (200 ms/div). Cada deflexão do sinal, com intervalo de 2 s, corresponde a um trio de pulsos bipolares. .... 35

Figura 4.8 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual com pulso monopolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.1. \*  $p < 0,001$  uni vs. multidirecional; #  $p < 0,001$  vs.  $2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$  (teste de Bonferroni). .... 37

Figura 4.9 – Resposta de miócitos ventriculares a estimulação manual em três direções com pulso monopolar e  $1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ . Os dados correspondem à porcentagem de células que responderam ao estímulo em apenas uma, em duas ou nas três direções (intersecções). De um total de 161 células (15 populações, Tabela 4.1), 18,6% não responderam à estimulação em nenhuma direção. .... 39

Figura 4.10 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulso monopolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.3. \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni). .... 40

Figura 4.11 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (3 direções) manual com pulso bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.4. \*  $p < 0,001$  uni vs. multidirecional; #  $p < 0,01$  vs.  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$  (teste de Bonferroni). .... 42

Figura 4.12 – Resposta de miócitos ventriculares a estimulação manual em três direções com pulso bipolar e  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ . Os dados correspondem à percentagem de células que responderam ao estímulo em apenas uma, em duas ou nas três direções (intersecções). De um total de 188 células (16 populações, Tabela 4.4), 22,3% não responderam à estimulação em nenhuma direção. .... 43

Figura 4.13 – Percentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulso bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.6. \*  $p < 0,001$  vs. Estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. Estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni). .... 45

Figura 4.14 – Percentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulsos mono e bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$  com pulso monopolar e  $E_{TM-BIPOLAR}$  com pulso bipolar) da população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados nas Tabela 4.3 e 4.6. Não há diferença estatística entre os recrutamentos obtidos com pulso monopolar e os obtidos com pulso bipolar, de acordo com a análise de variância. \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni). .... 46

Figura 4.15 – Valores de  $E_{TM}$  (média  $\pm$  erro padrão) obtidos pela estimulação elétrica de um total de 46 populações (câmaras) de miócitos cardíacos isolados. Os valores de  $E_T$  correspondem ao menor valor de  $E$  capaz de gerar uma contração e foram obtidos de células alinhadas à direção de aplicação do estímulo, com duas formas de onda: pulsos mono e bipolares.  $E_{TM-BIPOLAR} = 3,2 \pm 0,1$  V/cm;  $E_{TM-MONOPOLAR} = 3,9 \pm 0,1$  V/cm. \*  $p < 0,0001$  vs.  $E_{TM-MONOPOLAR}$ . .... 46

Figura 4.16 – Percentagem de células recrutadas com a estimulação multidirecional automática com pulsos mono e bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$  e  $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ) das populações de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.7. \*  $p < 0,001$  vs.  $E_{TM-BIPOLAR}$  (teste de Bonferroni). .... 48

Figura 4.17 – Curvas de recrutamento celular em função da intensidade do campo elétrico ( $E$ ) estimulatório obtidas com estimulação multidirecional automática com pulsos mono e bipolares de miócitos ventriculares de rato. A intensidade de  $E$  foi variada entre 1,6 e 6,0 V/cm.

..... 49

Figura 5.1 – Curvas de letalidade (probabilidade de letalidade em função do  $E$  estimulatório) para células posicionadas longitudinal e transversamente à direção de aplicação do estímulo. Os pontos são os valores médios e as barras representam o intervalo de confiança para 95% (Oliveira *et al.*, 2008). .....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em 1 ou 3 direções (0, 60 e 120°). Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção. .... 37

Tabela 4.2 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em cada direção (0, 60 e 120°) e observou-se em quantas direções de aplicação do estímulo cada célula respondia. Os dados correspondem às intersecções da estimulação multidirecional manual. .... 38

Tabela 4.3 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°) e manualmente em 1 ou 3 direções. Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção. .... 40

Tabela 4.4 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi

aplicada manualmente em 1 ou 3 direções (0, 60 e 120°). Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção. .... 42

Tabela 4.5 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em cada direção (0, 60 e 120°) e observou-se em quantas direções de aplicação do estímulo cada célula respondia. Os dados correspondem às intersecções da estimulação multidirecional manual. .... 43

Tabela 4.6 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média ± erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°) e manualmente em 1 ou 3 direções. Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção. .... 44

Tabela 4.7 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos mono e bipolares de populações de miócitos cardíacos ventriculares de rato. Os valores referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses (média ± erro padrão). A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio obtido com pulsos mono ( $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ ) e bipolar ( $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ) na respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°). .... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

- b – Raio da câmara de estimulação
- CEB – Centro de Engenharia Biomédica
- CCD – *Charge coupled device*
- DC – *Direct current*
- $E$  – Campo elétrico
- $E_{50}$  – Intensidade do campo elétrico correspondente a um recrutamento de 50%
- $EL_{50}$  – Valor de  $E$  com probabilidade de 50% de letalidade
- $E_T$  – Intensidade limiar do campo elétrico excitatório
- $E_{TM}$  – Intensidade limiar média do campo elétrico excitatório
- $E_{TM-BIPOLAR}$  – Intensidade limiar média do campo elétrico excitatório obtido com pulso bipolar
- $E_{TM-MONOPOLAR}$  – Intensidade limiar média do campo elétrico excitatório obtido com pulso monopolar
- FV – Fibrilação ventricular
- $h$  – comprimento do eletrodo
- $I$  – Corrente elétrica que circula no interior da câmara de estimulação
- IC95% – Intervalo de confiança para 95%
- LED – *Light emitting diode*
- $n$  – Coeficiente de Hill da curva sigmóide
- NT – Solução de Tyrode
- PA – Potencial de ação
- RS – Retículo sarcoplasmático
- $\sigma$  – Condutividade da solução fisiológica de NT
- TyCl – Solução de Tyrode para Isolamento de Células
- VI – Virtual instrument
- $V_m$  – Potencial transmembrana

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A estimulação cardíaca por campos elétricos é o procedimento mais efetivo para a reversão de anomalias do ritmo cardíaco (arritmias), as quais podem colocar em risco a vida do indivíduo. As arritmias cardíacas estão, inclusive, entre as principais causas de morte da população mundial. Nos Estados Unidos, 35,3% das mortes se devem às doenças cardiovasculares, segundo dados de 2005 da *American Heart Association*, enquanto que no Brasil, este índice é de 32,2% (dados do Boletim Saúde Brasil 2007 do Ministério da Saúde).

O mau funcionamento do coração pode levar à morte, pois este é o órgão responsável por bombear o sangue para todo o organismo. O bombeamento efetivo depende da atividade rítmica e coordenada dos átrios e ventrículos, a qual, por sua vez, depende de um padrão seqüencial de excitação e contração. Se este padrão é alterado, ocorrem arritmias que prejudicam a função do órgão.

O coração é formado por quatro câmaras (dois átrios e dois ventrículos) que formam duas bombas separadas que funcionam em série: o coração direito, que bombeia o sangue para os pulmões, e o coração esquerdo, que bombeia o sangue para os demais tecidos. Os átrios recebem o sangue que chega ao coração pelas veias cavas e pulmonares, e bombeiam parte desse volume para os ventrículos. Estes, por sua vez, impulsionam o sangue para os circuitos vasculares pulmonar e periférico através do tronco arterial pulmonar e da aorta, respectivamente (Guyton & Hall, 2002).

O ritmo cardíaco é produzido por mecanismos especiais no coração, cujo principal marcapasso, o nódulo sinoatrial (nódulo SA), é formado por um grupo de células auto-excitáveis que está localizado no átrio direito. Próximo à base do átrio direito encontra-se o nódulo atrioventricular (nódulo AV), que consiste em outro grupo de células com propriedade de automatismo, porém com frequência intrínseca inferior à do nódulo SA. Do nódulo AV, saem fibras especializadas em condução elétrica que formam o chamado feixe de His (ou feixe átrio-ventricular), que se divide em ramos direito e esquerdo, e passa pelo septo interventricular em direção ao ápice do coração. Na região apical, as fibras de condução formam numerosos pequenos ramos (fibras de Purkinje), que penetram pelas paredes ventriculares, dirigindo-se às camadas parietais externas (epicárdio) e à base ventricular.

A atividade elétrica (excitação) inicia uma cadeia de processos que resulta no desenvolvimento de atividade contrátil. Para o sangue ser ejetado para a circulação a níveis

adequados de pressão, a onda de contração precisa se deslocar do ápice para a base dos ventrículos, de onde saem os principais vasos arteriais. Assim, o potencial de ação (PA, explicado a seguir de modo mais detalhado), que precede a contração, chega a diferentes regiões do coração em tempos diferentes, e apresenta duração diferente nessas regiões. A ejeção do sangue é favorecida pelo arranjo espiral da musculatura das paredes ventriculares (Figura 1.1) que, durante a contração, produz um movimento de “ordenha”, fazendo com que a cavidade intraventricular diminua em ambos sentidos (transversal e longitudinal), o que permite impulsionar o sangue através das aberturas arteriais na base dos ventrículos (Silverthorn, 2003).

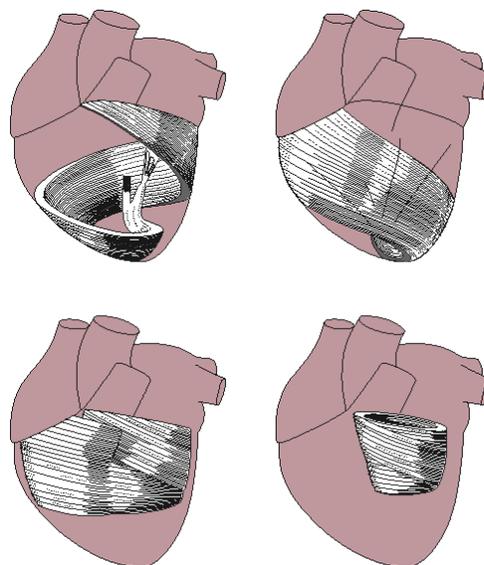


Figura 1.1 – Orientação das fibras musculares ventriculares: três grupos de fibras em arranjo espiral formam os dois ventrículos, e um outro grupo compõe apenas a estrutura muscular do ventrículo esquerdo (Malmivuo & Plonsey, 1995).

O miócito cardíaco responde a um estímulo elétrico com uma variação do potencial de membrana ( $V_m$ ). Em repouso,  $V_m$  varia entre -60 e -90 mV (negativo no meio interno em relação ao externo) (Garcia, 1998). Quando o miócito é estimulado eletricamente, o  $V_m$  torna-se menos negativo, e diz-se que a membrana foi despolarizada. Quando a despolarização alcança um determinado valor de potencial (limiar de excitação), ela induz o aparecimento de um PA. O PA ocorre devido à abertura rápida e massiva de canais iônicos (em especial, canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de tensão elétrica), e consiste numa variação brusca de  $V_m$  para valores positivos, com posterior retorno ao valor negativo de repouso. A partir do momento em que é

disparado, o PA não é mais controlado pelo estímulo externo e se propaga por toda a célula, por meio do acoplamento espacial da corrente elétrica (Aidley, 1998).

O PA das células ventriculares se caracteriza por possuir diversas fases (Bers, 2001; Garcia, 1998), como mostra a Figura 1.2: a) fase 0, de despolarização rápida, na qual o  $V_m$  parte de -70 a -80 mV e atinge +35 a +50 mV; b) fase 1, de repolarização inicial, que é rápida e parcial; c) fase 2, de platô, que corresponde ao período em que a taxa de repolarização é muito baixa, e  $V_m$  se mantém próximo a 0 mV; d) fase 3, de repolarização final, na qual a célula recupera o valor de repouso de  $V_m$ ; e) fase 4, que é a diástole elétrica ( $V_m$  de repouso) e que corresponde ao intervalo entre o final da repolarização e o início do PA seguinte. O platô (fase 2) é a fase mais longa e determina a duração do PA.

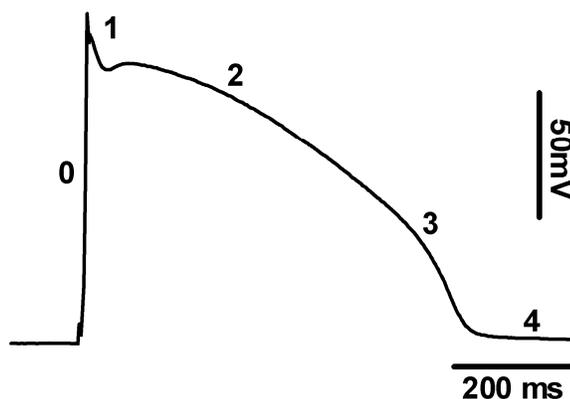


Figura 1.2 – Registro da variação do potencial de membrana ( $V_m$ ) em função do tempo durante um potencial de ação (PA) típico em um miócito ventricular de mamífero. Os algarismos indicam as fases do PA: fase 0 de despolarização rápida, fase 1 de repolarização inicial, fase 2 de platô, fase 3 de repolarização final e fase 4 de diástole elétrica. Modificado de Bers (2001).

No coração, a despolarização se inicia no nódulo SA e é propagada para as células atriais vizinhas através dos discos intercalares, os quais consistem em junções comunicantes especializadas que formam conexões de baixa resistência, fazendo o acoplamento elétrico entre as células (Garcia, 1998). A atividade elétrica se propaga até o nódulo AV, que consiste na única via pela qual os PAs podem alcançar as fibras contráteis dos ventrículos, e que gera um atraso na transmissão dos PAs. Este atraso na condução atrioventricular permite que os átrios se contraiam antes dos ventrículos e se deve a uma maior duração dos PA e a uma menor dimensão das células desta região, bem como às características dos canais de comunicação intercelular nesta região (Katz, 1992). A onda de excitação passa do nódulo AV

para o feixe de His, até alcançar as fibras de Purkinje, as quais transmitem os impulsos primeiramente pelo ápice e por toda superfície endocárdica e, em seguida, em direção à base e ao epicárdio. Pelo fato das fibras de Purkinje serem uma via de condução rápida, o impulso cardíaco chega a quase todas as regiões dos ventrículos em um pequeno intervalo de tempo (cerca de 50 ms) (Guyton & Hall, 2002).

Apesar de cada contração ventricular envolver a atividade de todas as células do coração (sincício cardíaco), cada célula individual está apta a responder a um estímulo elétrico e, por isso, é possível induzir atividade elétrica e contrátil em miócitos isolados.

Durante parte do PA, a célula é completamente refratária a novos estímulos, ou seja, ela é incapaz de disparar um novo PA, independente da intensidade do estímulo. Neste estado ela encontra-se no período refratário absoluto. Na parte final do PA (período refratário relativo), a célula já é capaz de responder com um novo PA a um novo estímulo, porém, este precisa ter maior intensidade do que o normal (Berne *et al.*, 2004). O conceito de período refratário tem bastante importância em se tratando de estimulação elétrica das células. Na situação *in vivo*, não há período refratário relativo, pois nesta situação o estímulo é sempre o mesmo (i.e., a onda de ativação elétrica transmitida de célula a célula). Porém, na estimulação elétrica artificial, é possível variar a intensidade do estímulo e aplicar um ou mais estímulos de acordo com a duração da refratariedade.

A estimulação elétrica é frequentemente utilizada para ativar tecidos excitáveis (como o tecido cardíaco), em substituição ao estímulo fisiológico. As células cardíacas podem ser estimuladas, por exemplo, pela aplicação de um campo elétrico externo. Neste caso, o campo gera um potencial externo cuja amplitude varia assimetricamente no espaço, permitindo que a célula responda ao estímulo gerando correntes transmembrana que disparam um PA, seguido de uma contração. Portanto, durante a estimulação por campo, o processo de excitação é semelhante àquele sob condições fisiológicas.

Quando se aplica um campo elétrico externo uniforme à célula, há a geração de um fluxo de corrente ao redor desta, o qual resulta num gradiente de potencial elétrico ao longo da superfície externa da célula. Como o potencial intracelular não muda,  $V_m$  varia espacialmente de acordo com o potencial externo. Assim, as regiões da membrana nos extremos da célula são polarizadas de maneira oposta, e cada parte da membrana experimenta um valor diferente de  $V_m$  (Knisley *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1999; Sharma & Tung, 2002; Oliveira *et al.*, 2008). Quando  $V_m$  atinge o valor crítico que leva à abertura de canais de  $Na^+$ , um PA é disparado e seguido pelo desenvolvimento de uma contração. O valor mínimo de campo capaz de causar o

disparo de um PA (e, conseqüentemente, de uma contração em células musculares) é chamado de campo limiar excitatório ( $E_T$ ).

Como os distúrbios do ritmo cardíaco são cada vez mais comuns na população, a estimulação elétrica do coração torna-se um procedimento terapêutico cada vez mais essencial, principalmente quando se trata da fibrilação ventricular (FV). Dentre as arritmias, a FV é a que apresenta o maior risco, pois consiste de uma ativação desorganizada dos miócitos, o que prejudica de modo considerável a capacidade do coração ejetar o sangue. Isto faz com que a FV seja a principal causa de morte súbita entre os adultos (Gray & Jalife, 1998; Jalife, 2000; Ten Tusscher *et al.*, 2007). Neste caso, para restaurar o ritmo e, conseqüentemente, a atividade bombeadora, é freqüentemente necessária a aplicação de campos elétricos de alta intensidade (desfibrilação). Campos elétricos muito elevados, contudo, exercem efeitos deletérios sobre o músculo cardíaco, podendo causar disfunções elétrica e contrátil temporárias, e até a morte celular (Tung, 1996). Por outro lado, é necessário que, durante a estimulação, a intensidade do campo elétrico seja alta o suficiente para a excitação de um grande número de células miocárdicas (Ideker *et al.*, 1995).

A interação do campo elétrico com o coração é complexa, pois o miocárdio, além de apresentar anisotropia elétrica (a resposta de uma célula a um estímulo endógeno ou exógeno depende da direção em que este é aplicado; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008), também possui fibras musculares dispostas em várias direções (ver Figura 1.1; Vetter *et al.*, 2005). Estas condições resultam na geração de gradientes não-uniformes de potencial e, conseqüentemente, as células no miocárdio ficam expostas a campos de magnitude amplamente variável (Vetter *et al.*, 2005). Logo, para que seja possível a excitação de um número significativo de células durante a desfibrilação, a intensidade do campo precisa ser elevada. Considerando, portanto, a organização complexa das fibras musculares e suas características, é improvável que o campo mínimo efetivo para desfibrilação esteja presente em todo órgão. Um campo elétrico de 1 V/cm é o suficiente para a excitação (Ideker *et al.*, 1995), mas durante a desfibrilação, dependendo de sua localização e orientação, algumas células podem ser expostas a campos maiores que 100 V/cm, como é o caso das células que encontram-se próximas aos eletrodos do desfibrilador (Yabe *et al.*, 1990). Esta intensidade de campo gera gradientes de potencial cerca de 20 vezes maiores que o limiar estimulatório (Tang *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 2008). Células submetidas a esta magnitude de campo, na direção longitudinal, têm mais de 50% de probabilidade de letalidade (Oliveira *et al.*, 2008).

A morte celular, que já acontece com campos superiores a 50 V/cm (Oliveira *et al.*, 2008), favorece a geração de bloqueio de condução (o que facilita a perpetuação da arritmia), podendo

contribuir para o insucesso da intervenção desfibrilatória e tornar mais difícil uma nova desfibrilação. A probabilidade de óbito, que é de 50% se a arritmia é tratada nos primeiros 5 minutos, aumenta 10% a cada minuto sem tratamento. Poucas tentativas de desfibrilação têm êxito após 10 minutos (Eisenberg *et al.*, 1980; Larsen *et al.*, 1993). O limiar desfibrilatório durante a FV costuma ser mais alto que o normal (15 V/cm após 10 s de FV vs. 6V/cm; Strobel *et al.*, 1998; Ideker *et al.*, 1995). Todos estes fatores tornam a desfibrilação um procedimento de alto risco.

Entre os efeitos indesejados que a desfibrilação pode causar sobre o coração, estão a depressão da função contrátil, necrose do tecido, distúrbio na condução do PA e outras alterações fisiológicas, como já observados *in vivo* (Dahl, *et al.*, 1974; Avitall, *et al.*, 1990; Yabe *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1993; Gazmuri *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1997; Tokano *et al.*, 1998), em preparações miocárdicas multicelulares (Soares, 2003) e em células cardíacas isoladas (Jones *et al.* 1978; 1987; Krauthamer & Jones, 1997; Cheng *et al.*, 1999; Cheek & Fast, 2004; Oliveira *et al.*, 2005, 2008).

Em estudos anteriores de nosso grupo, a geometria celular e a orientação do estímulo foram identificadas como importantes fatores na interação do campo elétrico com células cardíacas (Lima, 1999; Gomes *et al.*, 2001; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). No caso da orientação do estímulo, observou-se que a intensidade de  $E_T$  aplicado na direção longitudinal ao eixo maior da célula é cerca de 50% daquela requerida para estimulação na direção transversal (Tung *et al.*, 1991; Ranjan & Thakor, 1995; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira, 2004). A Figura 1.3 mostra como  $E_T$  varia com a orientação do campo elétrico em relação ao eixo maior da célula. A intensidade do campo capaz de levar à morte celular também depende da orientação do estímulo, com maior efeito letal quando aplicado na direção longitudinal (Oliveira *et al.*, 2008).

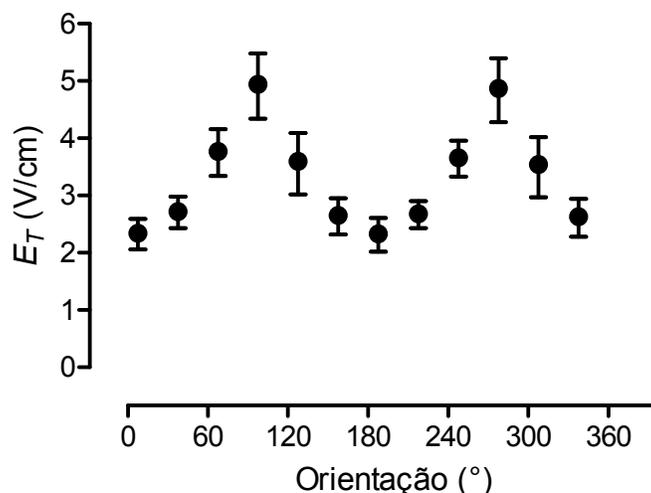


Figura 1.3 – Campo limiar excitatório ( $E_T$ ) em função da orientação (em graus) da direção de aplicação do estímulo em relação ao eixo maior da célula. Quando esta direção é perpendicular,  $E_T$  é o dobro do valor medido na mesma célula quando a direção do estímulo é paralela ao eixo maior da célula. Os pontos são os valores médios e as barras verticais indicam o intervalo de confiança para 95% (Bassani *et al.*, 2006).

Assim, para o desenvolvimento de procedimentos estimulatórios mais efetivos e seguros, é essencial que se procure aperfeiçoar a estimulação elétrica excitatória, buscando utilizar campos de intensidade inferior à faixa que provoca efeitos lesivos. Privilegiar a estimulação na direção longitudinal seria um modo de minimizar a intensidade do campo estimulatório efetivo. No entanto, um obstáculo de natureza prática é a complexa orientação espacial dos miócitos no tecido cardíaco. É possível, porém, variar a direção com a aplicação seqüencial de estímulos através de vários pares de eletrodos em diferentes orientações em relação ao órgão (estimulação multidirecional). Embora haja relatos de sucesso na utilização de múltiplos eletrodos em testes preliminares *in vivo* (Exner *et al.*, 1994; Pagan-Carlo *et al.*, 1998; Jayanti *et al.*, 2007), ainda não está claro se isto se deve à efetividade da estimulação numa população maior de células.

No presente trabalho, buscou-se explorar esta possibilidade e contribuir para melhor caracterizar a resposta de células individuais à estimulação multidirecional. Para isto, foi desenvolvido e testado em populações de miócitos cardíacos isolados orientados de maneira aleatória um sistema de estimulação multidirecional que permite o chaveamento controlado de estímulos seqüenciais para diferentes pares de eletrodos. Isto possibilitou analisar a relação entre intensidade e número de direções de aplicação do estímulo na excitação da mesma preparação biológica.

## CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a hipótese de que a estimulação multidirecional é mais efetiva do que a estimulação em uma única direção na excitação de células cardíacas durante processo de estimulação miocárdica por campos elétricos.

Os objetivos específicos foram:

- a) desenvolver e testar, em populações de miócitos cardíacos isolados orientados de maneira aleatória, uma instrumentação que permita a aplicação da estimulação multidirecional automática (rápida variação da direção, da ordem de milissegundos);
- b) comparar a efetividade excitatória da estimulação elétrica uni e multidirecional;
- c) analisar como a forma de onda do estímulo afeta o recrutamento excitatório durante a aplicação de campos elétricos em uma e três direções.

## CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 MIÓCITOS VENTRICULARES

#### 3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (3-7 meses de idade) de ambos os sexos provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB-UNICAMP) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB-UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, onde receberam água e ração à vontade, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Os ratos não sofreram nenhuma manipulação experimental até o dia de serem sacrificados para o isolamento das células (exceto pelos procedimentos de limpeza das gaiolas).

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Instituto de Biologia / UNICAMP; certificados No. 1186-1, 1517-1 e 1737-1).

#### 3.1.2 Soluções fisiológicas

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, com exceção das soluções utilizadas no isolamento dos miócitos, que foram preparadas com água ultrafiltrada (tipo I, resistividade > 18 M $\Omega$ .cm). As concentrações dos solutos nas soluções apresentadas a seguir estão expressas em milimolar (mM), e o pH de todas as soluções foi 7,4.

Solução de Tyrode Ø Cálcio: NaCl 140; KCl 6; MgCl<sub>2</sub> 1,5; ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N<sup>o</sup>-2 etano-sulfônico (HEPES) 5; glicose 11.

Solução de Tyrode normal (NT): Mesma composição da Tyrode Ø Cálcio, porém com a adição de 1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

Solução Krebs-Henseleit modificada: NaCl 115; KCl 4,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; MgSO<sub>4</sub> 2,4; glicose 11.

Solução cardioplégica:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10; KCl 30;  $\text{MgCl}_2$  1; taurina 20; glicose 11; HEPES 10; ácido glutâmico 70.

Solução de Tyrode para Isolamento de Células (TyCl): tem composição igual a NT, porém,  $\text{CaCl}_2$  é substituído por  $\text{MgCl}_2$  e a concentração de HEPES é de 10 mM.

### 3.1.3 Isolamento das células

Os miócitos ventriculares foram isolados por digestão enzimática do coração (Bassani *et al.*, 1992; Bassani & Bassani, 2002).

Os ratos foram sacrificados por exsanguinação após concussão cerebral, com imediata retirada do coração. Inicialmente, o coração foi perfundido por 5 min em um sistema de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit sem cálcio, a 37 °C. Para a digestão enzimática, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,8-1,0 mg/ml de colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) durante 15-20 min, ou até que o tecido ficasse flácido. Em seguida, a enzima foi removida por perfusão com solução TyCl contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml) por cerca de 10 min. O ventrículo direito foi descartado, e o tecido ventricular esquerdo junto com o septo foi delicadamente triturado em solução cardioplégica para a dissociação das células. Esta mesma solução foi usada para lavagem e armazenamento das células.

## 3.2 DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

### 3.2.1 Câmara de estimulação

A câmara de estimulação utilizada nos experimentos é feita de acrílico transparente e possui formato cilíndrico de secção transversa circular, com raio de 10 mm, altura de 5 mm e volume de 1,57 ml. A borda da câmara, mostrada na Figura 3.1, é saliente e possui seis orifícios espaçados em 60°. Estes orifícios permitem a passagem dos eletrodos de estimulação, os quais são feitos de platina, possuem 5 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, e ficam posicionados perpendicularmente ao fundo da câmara.

A base da câmara é formada por uma lamínula de vidro, onde são depositadas as células cardíacas para estimulação. Sob esta lamínula, existe uma peça de acrílico opaco com um orifício central com diâmetro de 4 mm, que permite a passagem de luz do microscópio e

delimita a área de trabalho. O tamanho deste orifício foi determinado por meio de cálculos, a partir do mapeamento do campo elétrico no interior da câmara (Bassani *et al.*, 2006), de forma que o campo elétrico nesta área fosse uniforme durante a estimulação (variação do campo menor que 1% em módulo e menor que 1° em direção). Na área de trabalho, portanto, era onde se encontravam as células observadas no microscópio.

Os seis eletrodos colocados nos orifícios da câmara de estimulação formam três pares, e cada par corresponde a uma direção de estimulação, as quais foram definidas como 0° (referência), 60° e 120°.

### **3.2.2 Estimulador elétrico para estimulação manual**

O estimulador elétrico utilizado, desenvolvido e fabricado na Área de Pesquisa e Desenvolvimento do CEB-UNICAMP (OS. 01581/97; fonte auxiliar: OS. 0198/97), fornece pulsos retangulares de tensão com forma de onda mono e bipolar, amplitude de 0 a 40 V, duração de 0,5 a 30 ms e frequência de 0,125 a 33,3 Hz. Sua alimentação é feita por fontes de tensão simétricas de 15 e 40 V. A amplitude da corrente elétrica fornecida pelo estimulador (a mesma que fluía no interior da câmara entre os eletrodos) varia entre 0 e 100 mA, e foi medida por meio de um resistor de precisão de 10,048  $\Omega$  em série com a carga (volume condutor no interior da câmara contendo a solução fisiológica e as células). A partir da corrente, foi possível estimar o valor do campo elétrico ( $E$ ), como descrito no item 3.3.3.

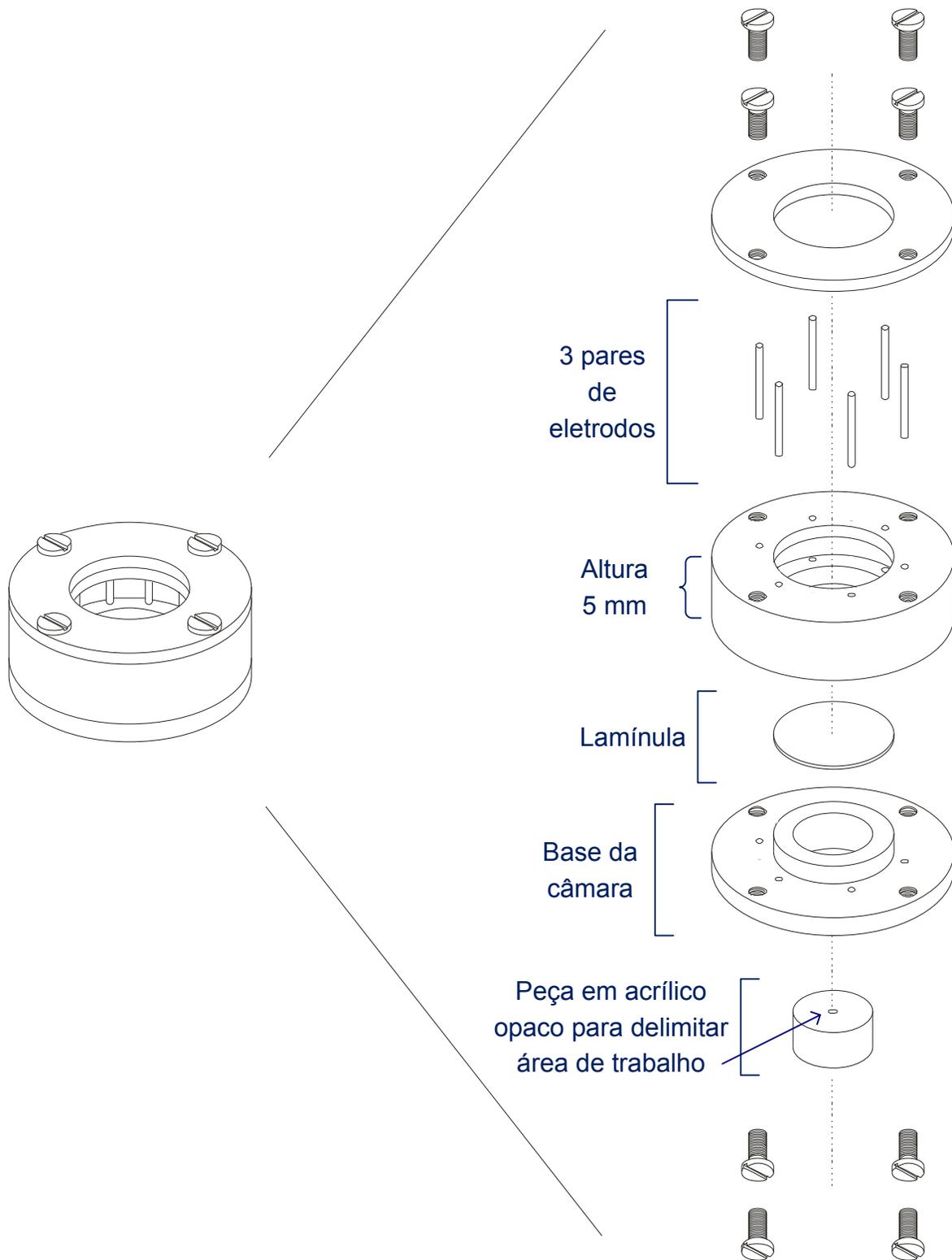


Figura 3.1 – Vista explodida da câmara de estimulação cujo raio da base mede 10 mm (Lima, 1999).

### 3.2.3 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos monopolares

#### 3.2.3.1 Circuito de chaveamento

Foi desenvolvido um circuito de chaveamento para que os estímulos chegassem defasados no tempo a cada par de eletrodos da câmara de estimulação ( $0^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $120^\circ$ ) por um período inferior a 30 ms, de modo que o último estímulo (de um total de três, um de cada direção) fosse aplicado ainda dentro do período refratário absoluto do potencial de ação, cuja duração em células ventriculares de rato é inferior a 80 ms à temperatura ambiente (Bassani *et al.*, 1994). Este circuito era composto por três interruptores que faziam a ligação entre uma fonte de tensão variável (duas fontes DC conectadas em série; modelo PS281, 0-30 V, Tektronix Inc., Beaverton, OR., U.S.A.) e os pares de eletrodos (um interruptor conectado a cada par), como mostrado na Figura 3.2. Pulsos de controle determinavam a condução destes interruptores, a qual dependia da duração, do intervalo (tempo entre o final de um pulso e o início do pulso seguinte no outro par de eletrodos) e do atraso do pulso em relação ao pulso anterior (tempo entre a subida dos dois pulsos de direções diferentes).

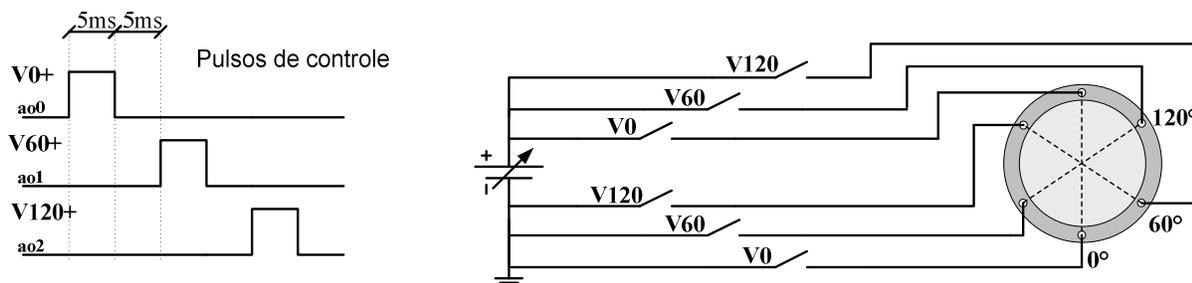


Figura 3.2 – Esquema do sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos monopolares. Os pulsos de controle determinam o tempo, da ordem de milissegundos, em que os interruptores conduzem. Os interruptores estão conectados aos pares de eletrodos da câmara de estimulação, a qual está ilustrada à direita.

A fonte de tensão variável era usada para controlar a amplitude dos pulsos de tensão de estimulação e, por consequência, a corrente gerada na câmara durante a aplicação do  $E$  desejado. O resistor de precisão usado para medir a corrente, neste caso, de  $6,8 \Omega$  (5 W, 5%), foi colocado em série com a fonte de tensão (e, por consequência, com a carga quando qualquer um dos interruptores estivesse conduzindo), como mostrado na Figura 3.3.

Os interruptores usados foram relés ultra-miniaturas (Metaltex, modelo MQ2RC-5V) com dois contatos reversíveis, cujo tempo de comutação é de, no máximo, 2 ms. Os relés comutam

quando suas bobinas são energizadas. A circulação de corrente pela bobina ocorria quando o sinal de controle alcançava a base de um transistor NPN 2N2222 através de um *buffer* não-inversor CD4050B em série com um resistor de 560  $\Omega$ . Um diodo 1N4148 foi ligado em paralelo com a bobina do relé para permitir a circulação de corrente enquanto a bobina descarregava. Um circuito com esta configuração (Figura 3.3) foi montado para o controle de cada relé (três no total). A Figura 3.4 ilustra o circuito completo, com os três interruptores e com dois *buffers* em paralelo na base de cada transistor. Isso se deve ao fato do circuito integrado CD4050B possuir seis *buffers* e, para que não ficassem sem conexão, três *buffers* foram usados aos pares, sem que sua função fosse alterada.

O circuito integrado de *buffers* e os relés eram alimentados com 5 V (fonte DC, modelo PS281, 0-30 V, Tektronix Inc., Beaverton, OR., U.S.A.).

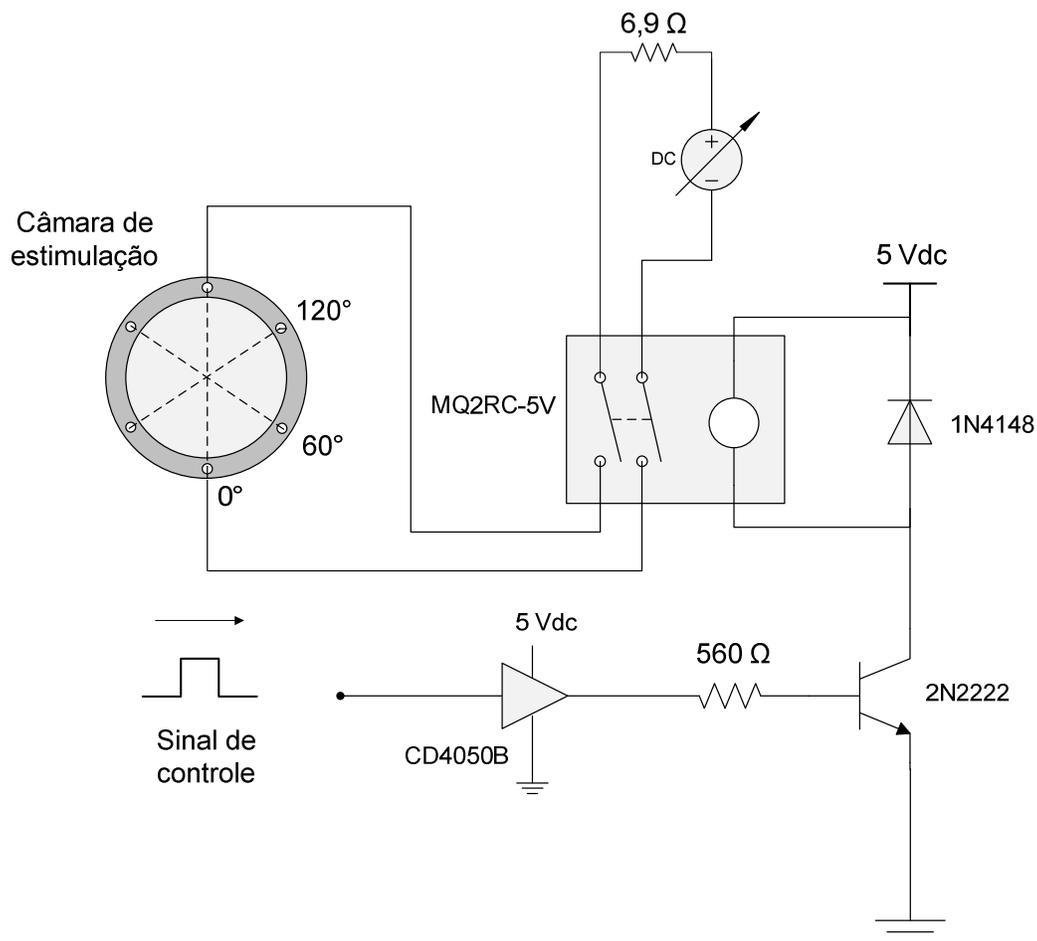


Figura 3.3 – Circuito de chaveamento correspondente à direção 0°.

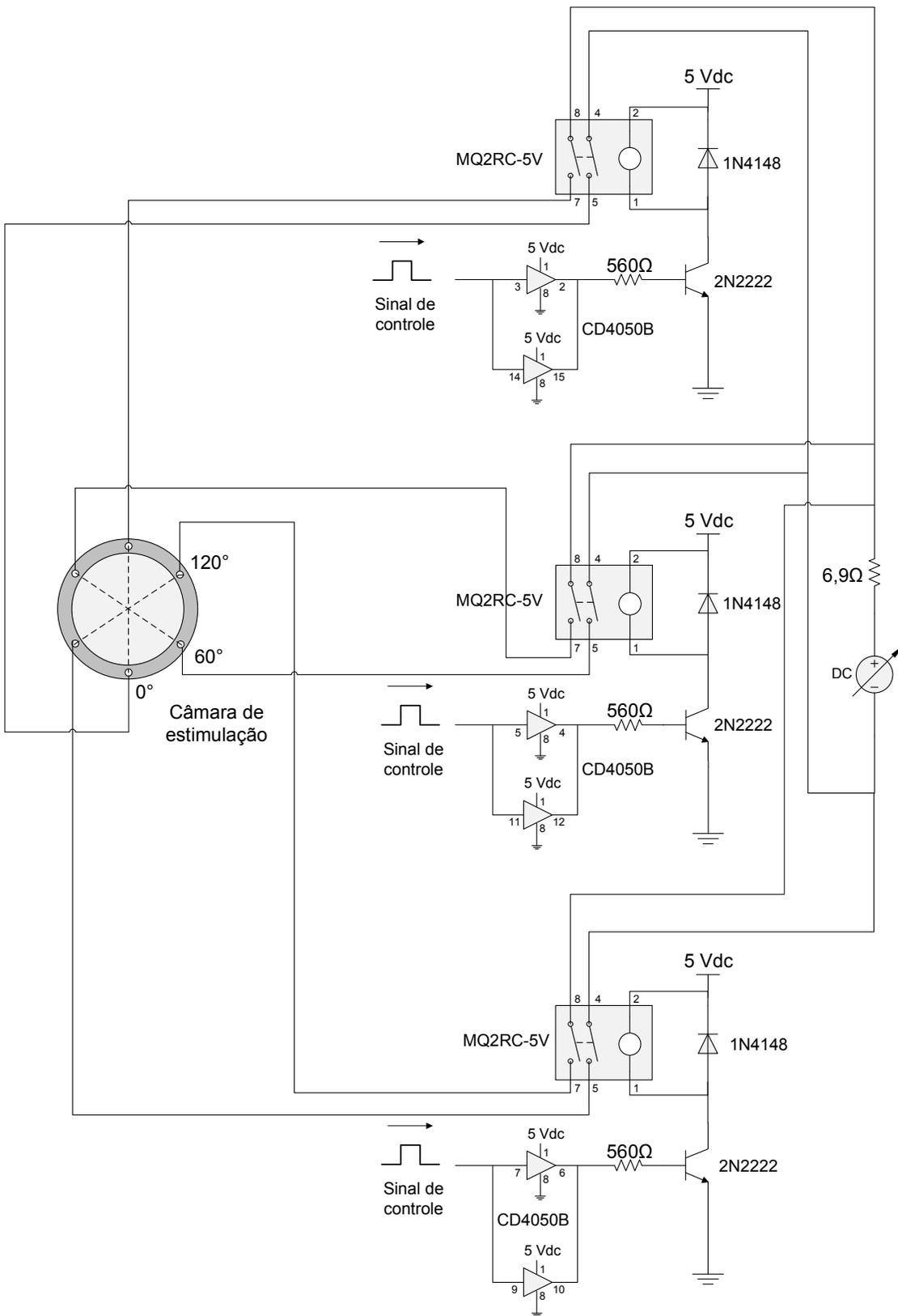


Figura 3.4 – Circuito de chaveamento completo conectado à câmara de estimulação.

### 3.2.3.2 Controle do chaveamento

O controle dos relés foi feito com um programa desenvolvido na plataforma LabView™, um ambiente de programação gráfica da *National Instruments*, capaz de, entre outras funções, gerar sinais analógicos e digitais para controle de instrumentos. Os programas em LabView™, chamados de instrumentos virtuais (VI – *Virtual Instrument*), possuem um diagrama de blocos, no qual estão as instruções e funções lógicas (código fonte do programa), e um painel frontal, que faz a interface gráfica com o usuário. No diagrama de blocos, ou seja, na área de programação do VI, são colocados os blocos de operações e as conexões entre eles. Neste mesmo diagrama se faz o controle dos dispositivos de I/O (aquisição de dados e geração de sinais analógicos e digitais). No painel frontal, o usuário pode, por meio de botões, gráficos e indicadores analógicos, por exemplo, ajustar valores de entrada (controle) e observar os valores de saída (indicadores) processados no diagrama de blocos. Cada elemento do painel possui um ícone correspondente no painel de programação (diagrama de blocos).

Para a geração de pulsos retangulares monopolares de tensão a serem enviados ao circuito de chaveamento para controlar o acionamento de relés, utilizou-se a função *Simulate Signal*. Com esta função, é possível determinar a forma de onda do sinal e seus parâmetros (frequência, *duty cycle*, amplitude, *offset* e fase), cujos valores podem ser variados no painel frontal com o uso dos controles numéricos. Utilizou-se um bloco *Simulate Signal* para cada sinal gerado (três no total), como se vê na Figura 3.5, e estes blocos foram conectados ao bloco da função *DAQ-Assistant*, a partir da qual era possível configurar a placa de aquisição de dados (placa PCI 6229, *National Instruments*, controle digital e analógico de baixa potência) ligada ao computador.

Para a função *DAQ-Assistant*, escolheu-se a tarefa de saída analógica para a geração contínua de sinais de tensão. Assim, três sinais eram enviados ao *hardware* (circuito de chaveamento) através dos canais ao0, ao1 e ao2. O indicador gráfico *Waveform Graph* permitiu a visualização dos pulsos gerados no painel frontal (Figura 3.6).

Todos estes blocos foram colocados dentro da rotina “*While*”, uma estrutura de programação que faz com que o programa seja executado de forma contínua, parando apenas quando o botão *Stop* é acionado pelo usuário.

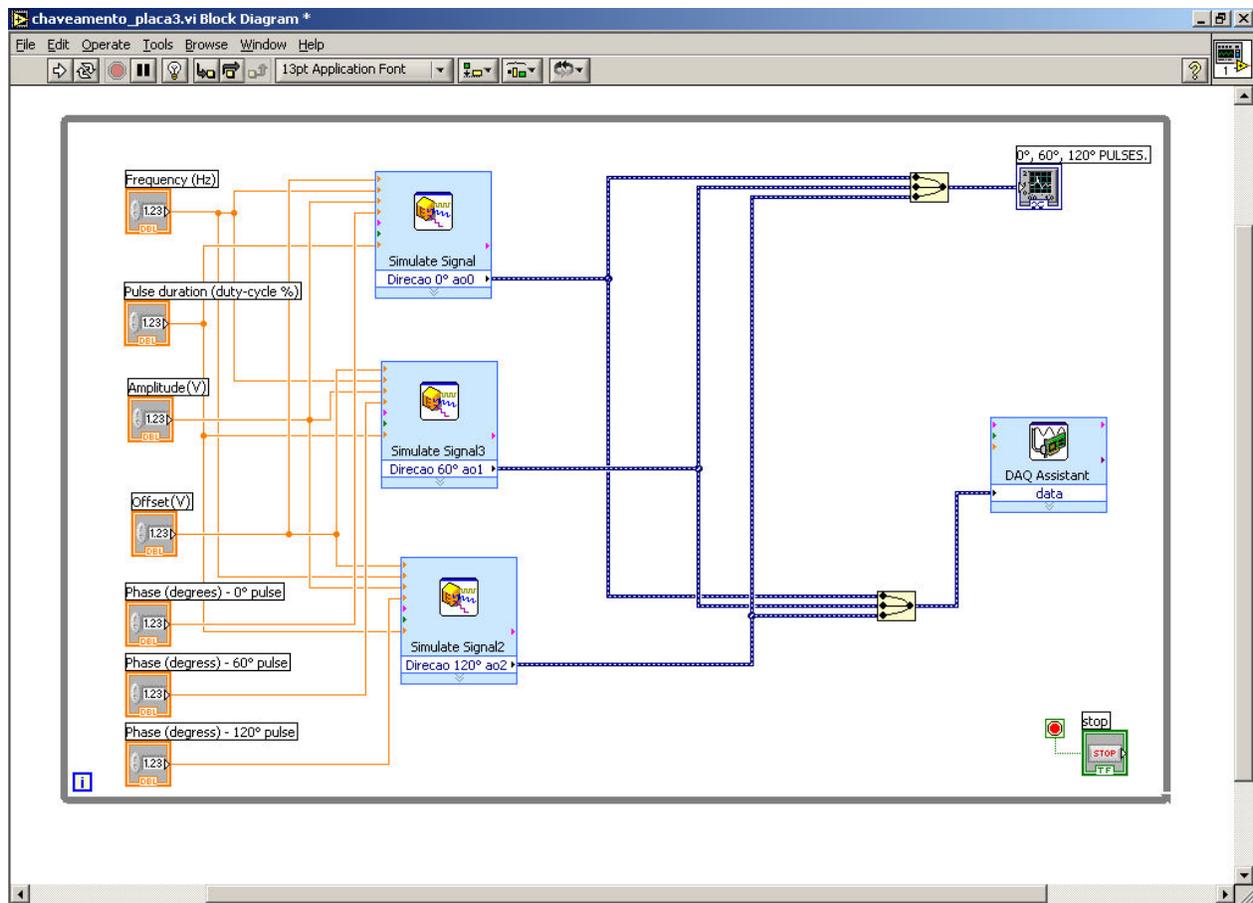


Figura 3.5 – Diagrama de blocos. O fluxo de dados e a ordem de execução dos comandos ocorrem da esquerda para a direita no painel de programação, de forma seqüencial, e estão determinados pelas operações ou funções que processam os dados.

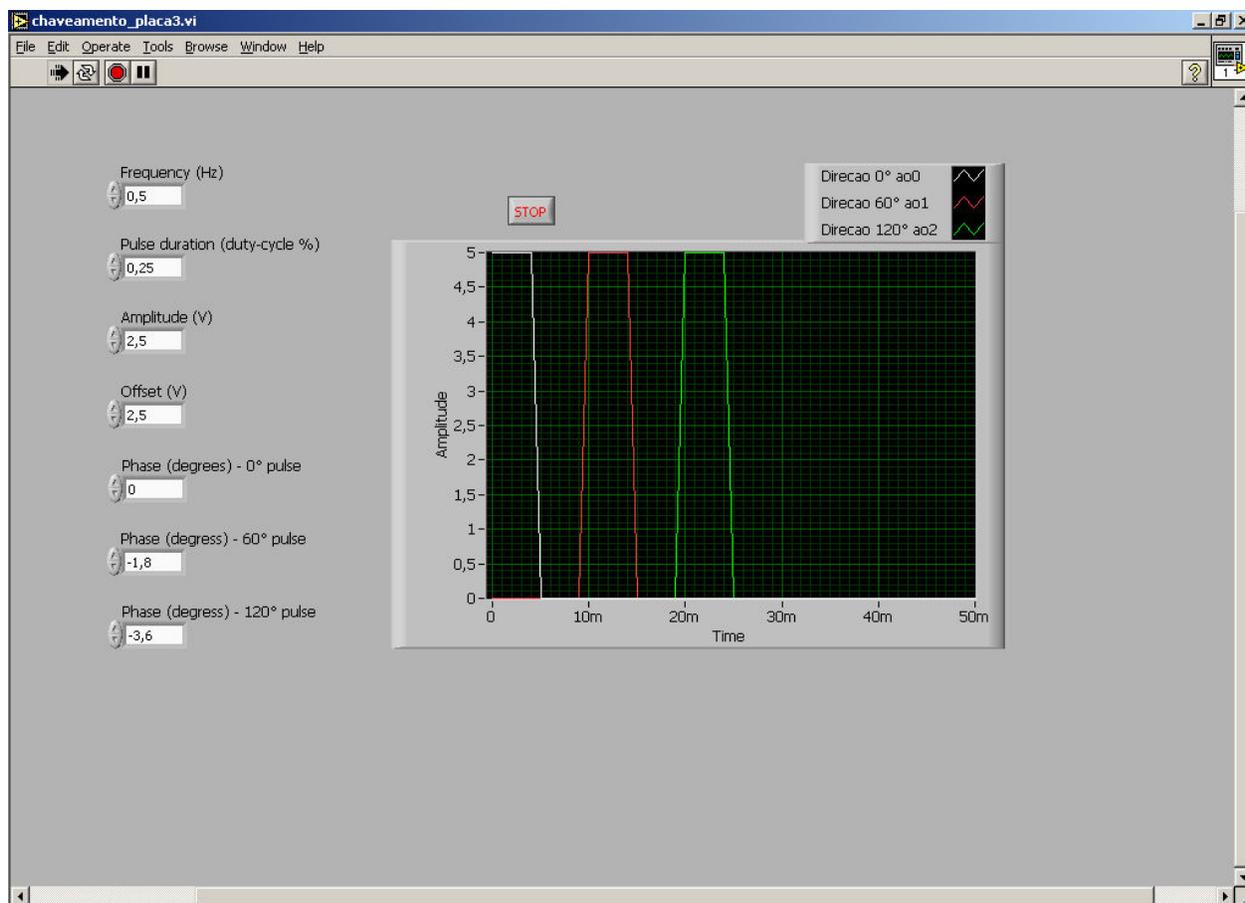


Figura 3.6 – Painel frontal com controles numéricos e o indicador gráfico.

## 3.2.4 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos bipolares

### 3.2.4.1 Circuito de chaveamento

Para a geração de pulsos bipolares seqüenciais dentro do intervalo de tempo correspondente ao período refratário do potencial de ação, o circuito de chaveamento utilizado foi similar ao circuito para pulsos monopolares, porém, ao invés de três interruptores, foram utilizados seis (relés ultra-miniaturas Metaltex, modelo MQ2RC-5V). Dois interruptores foram conectados a cada par de eletrodos, de modo que um interruptor gerava a forma de onda correspondente à fase positiva do pulso bipolar, e o outro interruptor, aquela correspondente à fase negativa. Para isto, os interruptores foram ligados com a polaridade invertida à fonte de tensão variável (Figura 3.7). A medição da corrente no interior da câmara foi realizada do

mesmo modo que o usado para estimulação com pulsos monopolares e o valor do resistor de precisão também foi de  $6,9 \Omega$  (Figura 3.8).

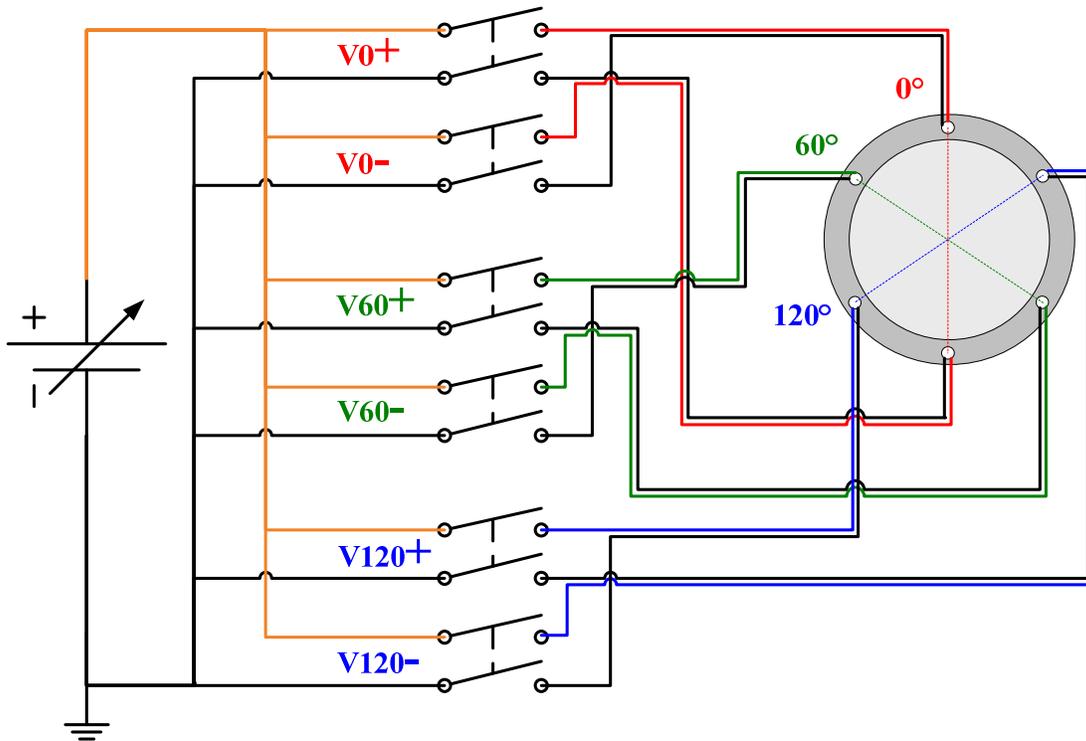


Figura 3.7 – Esquema da conexão dos interruptores do sistema de estimulação multidirecional automática com pulsos bipolares.

Os outros componentes utilizados no circuito foram iguais aos do circuito para pulso monopolar (diodos, transistores, resistores, fonte de tensão variável e fonte de 5 V para alimentação dos relés), com exceção do *buffer*, que neste caso não foi utilizado, e com a adição do circuito integrado mostrado na Figura 3.8.

### 3.2.4.2 Circuito de controle

O controle da comutação dos relés era realizado pelo micro-controlador PIC 16F84A (circuito integrado de 18 pinos, Microchip Technology Inc., U.S.A.; ver Figura 3.8). Um micro-controlador se caracteriza por conter, no mesmo encapsulamento, um processador, memórias de programa (ROM) e de dados (RAM), e vários periféricos, como temporizadores e conversores analógico/digital. O PIC 16F84A tem 68 bytes de RAM, manipula informações de 8 bits e instruções com 14 bits de largura. O programa foi carregado no micro-controlador por meio de um processo de gravação, e sua alimentação foi feita pela fonte de 5 V através do pino

14. Um oscilador (cristal de 4 MHz) foi conectado entre as portas de entrada e saída do *clock* (pinos 15 e 16) para ser a base temporal dos ciclos de instrução.

O micro-controlador foi programado para gerar um trem de pulsos. Através de seis portas configuradas para saída (RB0 – RB5), pulsos retangulares de tensão (5 V e 5 ms de duração), defasados em 5 ms, eram enviados para o controle do chaveamento a uma frequência de 0,5 Hz. Como a conexão dos relés era feita de modo invertido para que fossem gerados pulsos com polaridades inversas em cada par de eletrodos, cada dois sinais de saída do PIC geravam, na câmara, um pulso estimulatório bipolar com o dobro da duração (10 ms), como mostrado na Figura 3.9.

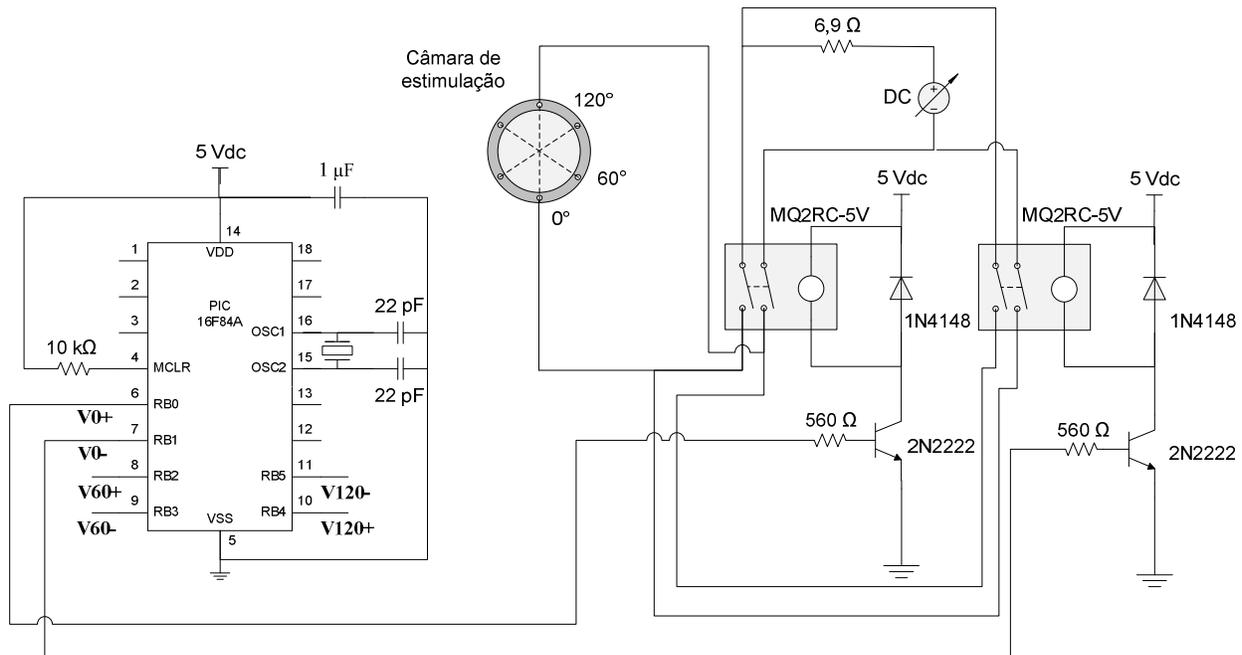


Figura 3.8 – Circuito de chaveamento correspondente à direção 0° para a geração de pulsos bipolares através de dois relés.

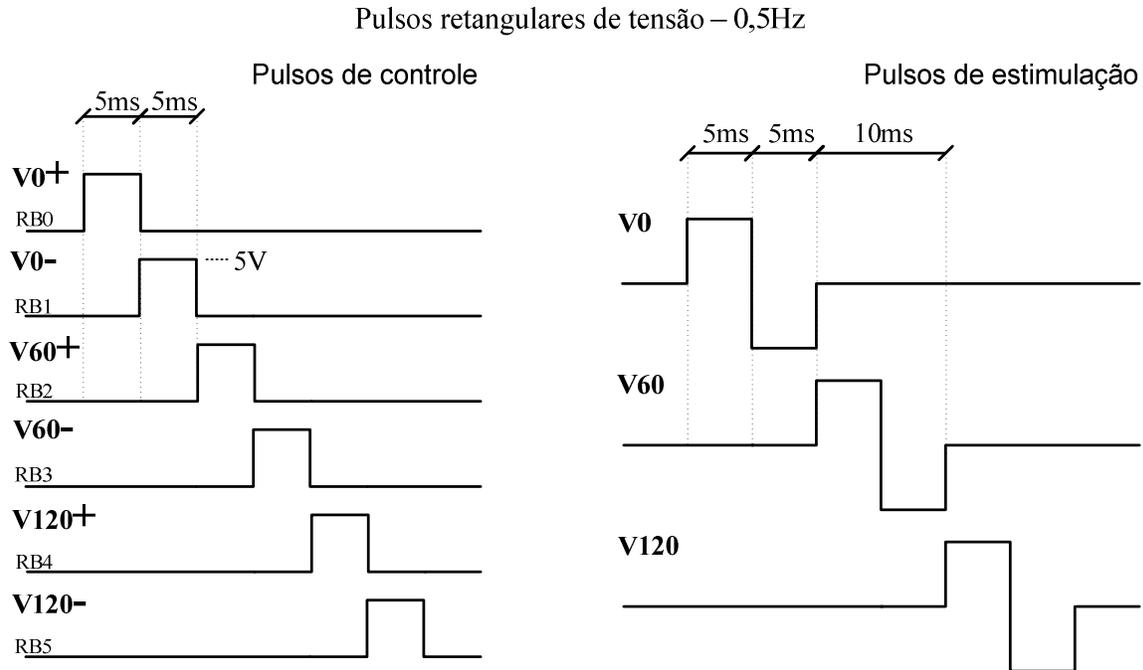


Figura 3.9 – Seis pulsos de controle monopulares na saída do PIC geram três pulsos estimulatórios bipolares na saída dos relés.

Se apenas as saídas RB0, RB2 e RB4 fossem utilizadas, ter-se-ia uma estimulação multidirecional com pulsos monopulares igual à obtida com o uso do Labview<sup>TM</sup>. Assim, foi possível desenvolver um estimulador elétrico multidirecional (OS. 09/3973), com o uso do circuito da Figura 3.8, que permite o uso das duas formas de onda (pulsos mono e bipolares). Como mostra a Figura 3.10, o estimulador possui uma chave seletora da forma de onda, saída para três pares de eletrodos (direções 0°, 60° e 120°), outra saída para monitorar a corrente sobre o resistor em série com a carga (câmara de estimulação) e uma entrada para a fonte de tensão variável do circuito de potência, além de uma chave liga/desliga para a alimentação dos componentes do circuito feita por uma bateria interna.



Figura 3.10 – Estimulador elétrico multidirecional desenvolvido no CEB que permite selecionar a forma de onda (pulsos retangulares de tensão mono e bipolar). Possui três saídas (uma para cada direção de estimulação), um monitor de corrente e uma entrada para a fonte variável de tensão.

### 3.2.5 Osciloscópio

A medição dos pulsos de tensão na saída dos relés, nos canais da placa de aquisição do LabView™ e nas portas do PIC, e o monitoramento da corrente pela queda de tensão sobre o resistor de precisão foram feitos com um osciloscópio digital (modelo TDS-210, 60 MHz, Tektronix Inc. Beaverton, OR., U.S.A.). Posteriormente, com outro osciloscópio digital (DSO3062A, 60 MHz, Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA., U.S.A.) conectado ao computador, utilizou-se um programa (3000 Series Scope Connect Software, Version 1.1.27, Agilent Technologies Inc., 2005) para a aquisição da imagem destes sinais.

### 3.2.6 Sistema de microscopia

Durante os experimentos, a câmara de estimulação foi colocada sobre o estágio de um microscópio (Zeiss, West Germany) que possui um sistema de iluminação baseado em um LED (*light emitting diode*) vermelho de alta luminância (*Super Bright LED*, Jumbo, 5000 mcd, 1,85 V, 20 mA, Archer, N. Cat. 276 - 086) alimentado por uma bateria de 9 V. A luz atravessa a câmara pelo orifício da peça de acrílico opaco (área de trabalho), atingindo a objetiva (Carl Zeiss, Plan 0,16 com amplificação de 6,3x). A imagem das células na área de trabalho foi

captada por uma câmera de vídeo CCD (*Charge Coupled Device*, Ikegami; ICD-31) e mostrada em um monitor de vídeo de nove polegadas (Kodo Electronics, modelo KBM 9005).

A magnificação total pelo sistema de microscopia foi estimada utilizando uma gráticula-padrão com precisão de 10  $\mu\text{m}$  (fabricação Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), a qual foi posicionada sobre o estágio do microscópio, e centralizada no monitor de vídeo. Uma régua foi posicionada diretamente sobre a região central da tela do monitor, e mediu-se, com cuidado para evitar erros de paralaxe, o comprimento ( $L$ , em mm) de 100  $\mu\text{m}$  da gráticula. Assim, estima-se que o aumento (dado por  $L/0,1$ ) seja de 110x.

A documentação de cada experimento foi feita pelo programa editor de vídeo Pinnacle Studio (v. 7.15.1), que gravava a imagem em tempo real através de uma placa de captação de sinal de vídeo (Pinnacle DC10plus, Motion-JPEG VideoIO Board). A Figura 3.11 ilustra a montagem experimental.

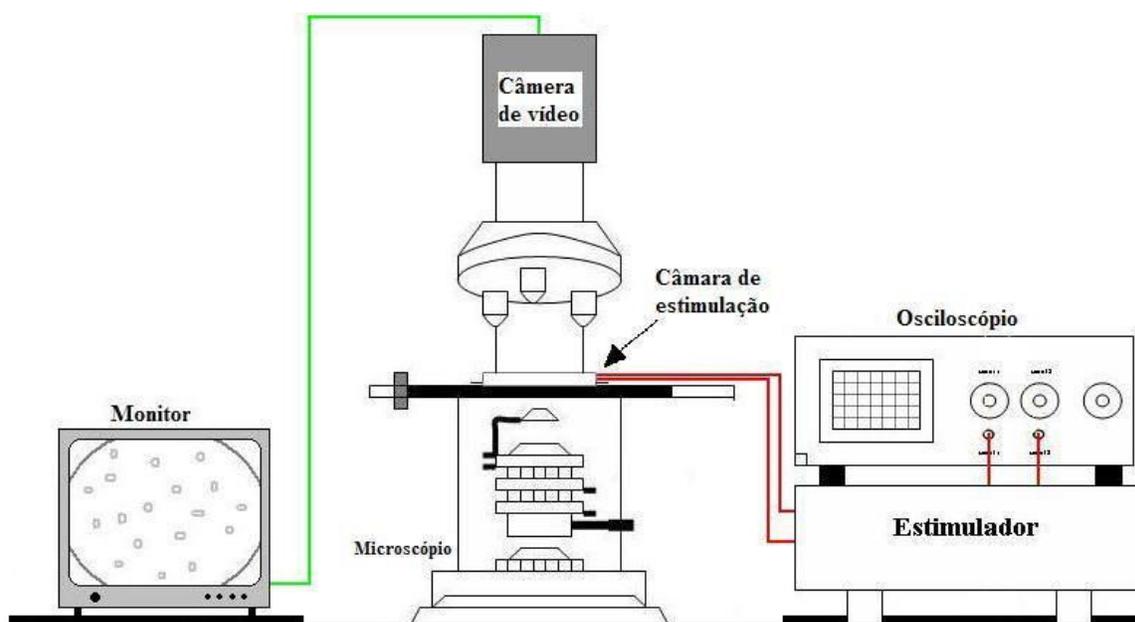


Figura 3.11 – Montagem experimental usada para a execução da estimulação elétrica das células. A câmara de estimulação foi conectada ao estimulador e a imagem do campo microscópico foi captada pela câmera de vídeo e mostrada no monitor de vídeo. Com o osciloscópio ligado ao estimulador, fez-se o monitoramento dos estímulos.

## 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.3.1 Manipulação das células

Cerca de 600  $\mu\text{l}$  da suspensão de células eram colocados em um tubo cônico para microcentrífuga (*eppendorf*), mantido na posição vertical. Após 15 min de repouso para a sedimentação das células, o sobrenadante era aspirado e trocado pelo mesmo volume da solução NT. O *pellet* de células era solubilizado, e 100  $\mu\text{l}$  desta suspensão eram colocados na câmara. Para que as células ficassem aderidas à lamínula, aguardavam-se mais 15 min e, então, o volume da câmara era completado com 1,47 ml de NT.

### 3.3.2 Estimulação das células por campo elétrico

Antes do início do experimento, era definida a população de células a serem estudadas, na qual foram incluídos apenas miócitos que não apresentavam alterações morfológicas e que respondiam à estimulação elétrica com  $E$  de 8,7 V/cm na direção definida com  $0^\circ$  (Figura 3.12). Este valor de  $E$ , escolhido arbitrariamente, corresponde a cerca de 2,5 vezes o limiar estimulatório determinado com aplicação de  $E$  paralelamente ao eixo maior da célula, como descrito a seguir, e era gerado por uma corrente de 100 mA (item 4.4.1).

Em seguida, determinou-se a intensidade limiar do  $E$  excitatório ( $E_T$ , mínimo  $E$  capaz de induzir uma contração) apenas nas células da população cujo eixo maior estivesse alinhado a alguma das 3 direções pré-definidas para estimulação. Essa medição foi feita reduzindo-se a intensidade do estímulo de 100 mA (8,7 V/cm) até que a célula parasse de se contrair. A intensidade era então aumentada para determinação do menor valor de corrente que causasse excitação da célula (corrente limiar). Os valores de corrente (medição sobre o resistor de precisão) foram posteriormente convertidos para valores de  $E$  (descrito no item 3.3.3). Os valores de  $E_T$  determinados numa dada população foram utilizados para o cálculo do  $E_T$  médio ( $E_{TM}$ ). A população de células foi então estimulada em cada uma das três direções com uma intensidade de  $E$  equivalente a um dado fator do  $E_{TM}$  determinado naquela população. Para cada direção, determinou-se a fração de células excitadas, ou seja, todas aquelas que responderam ao estímulo com uma contração detectada visualmente. As células recrutadas (excitadas) foram identificadas e contadas. O processo de estimulação foi realizado segundo três protocolos, aqui denominados estimulação unidirecional, estimulação multidirecional manual e estimulação multidirecional automática.

Para cada forma de onda estimulatória (monopolar ou bipolar), foi determinado o respectivo valor de  $E_{TM}$  ( $E_{TM-MONOPOLAR}$  e  $E_{TM-BIPOLAR}$ ), que serviu como referência para a escolha da intensidade dos estímulos-testes.

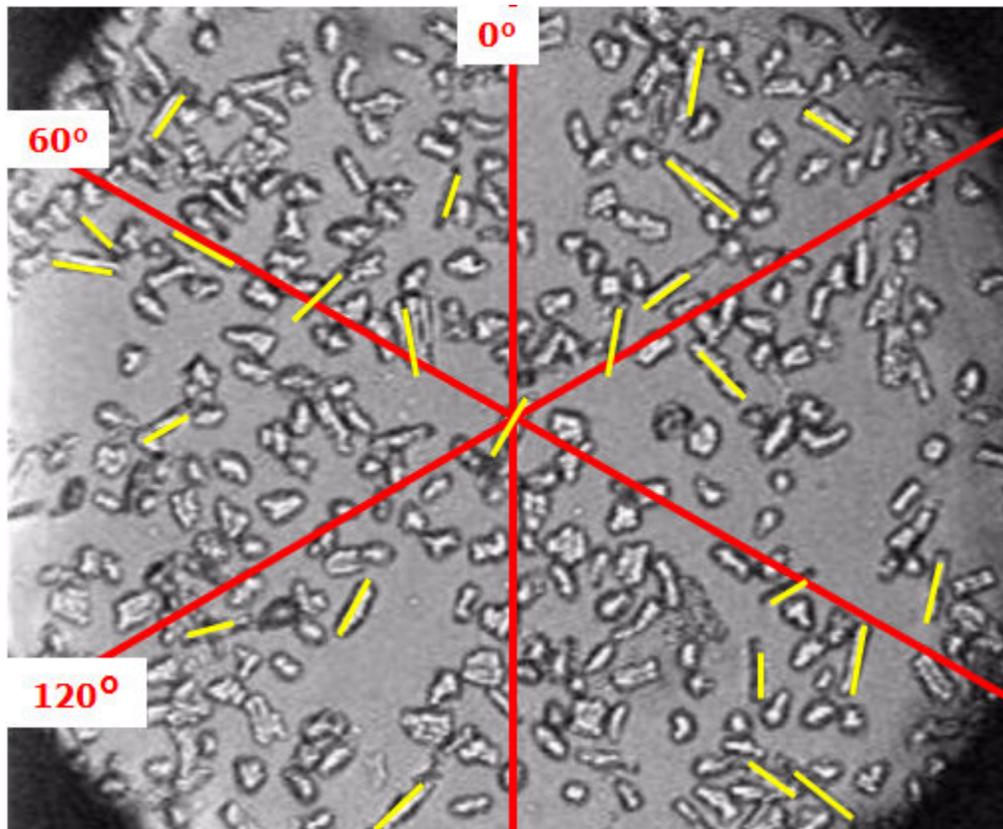


Figura 3.12 – Miócitos presentes na área de trabalho da câmara de estimulação. As células que compõem a população a ser estudada estão marcadas em amarelo. As linhas vermelhas representam as três direções estabelecidas para a estimulação ( $0^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $120^\circ$ ).

### 3.3.2.1 Estimulação multidirecional manual

A estimulação multidirecional manual foi feita com o estimulador fabricado no CEB (citado no item 3.2.2), utilizando-se pulsos retangulares de tensão, com as formas de onda monopolar (duração de 5 ms – Figura 3.13) e bipolar simétrica (duração total de 10 ms – Figura 3.14), aplicados na frequência de 0,5 Hz, e com três intensidades diferentes:  $1 \times E_{TM}$ ,  $1,2 \times E_{TM}$  e  $2 \times E_{TM}$ .

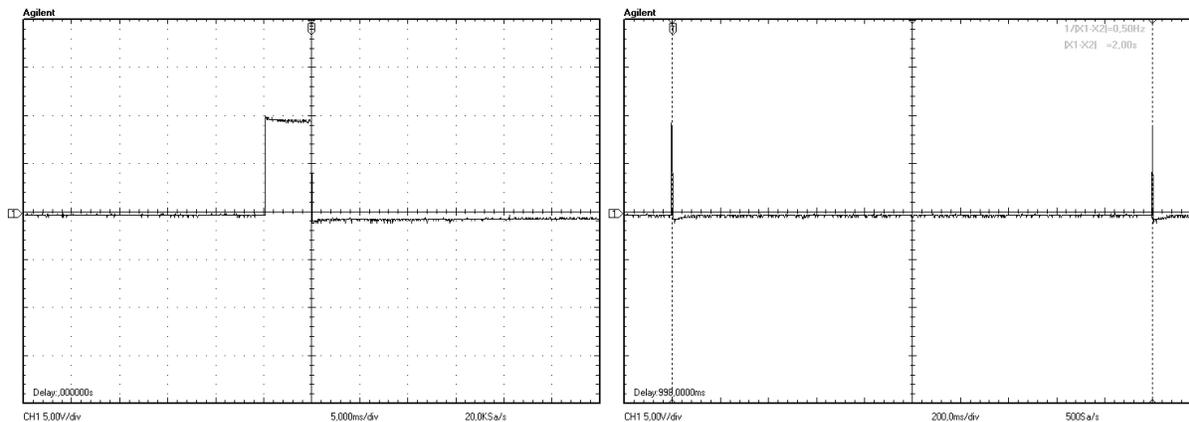


Figura 3.13 – Sinal de tensão, obtido por osciloscópio, sobre o par de eletrodos da direção  $0^\circ$ , durante aplicação do pulso monopolar com o estimulador fabricado no CEB. A escala de tensão é de 5 V/div. À esquerda, encontra-se o pulso com duração de 5 ms (intensidade arbitrária), numa escala de 5 ms/div, e à direita, a imagem em outra escala de tempo (200 ms/div) ilustrando a frequência de 0,5 Hz.

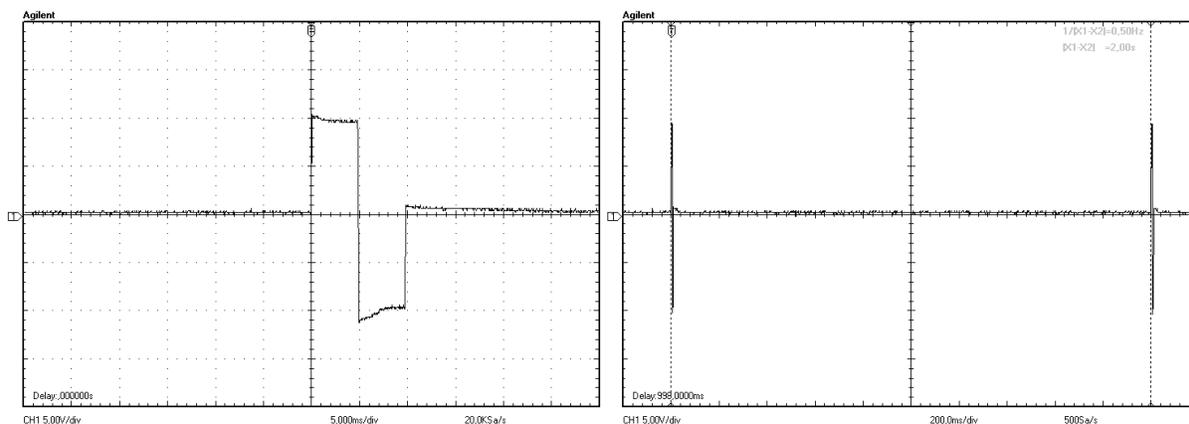


Figura 3.14 – Sinal de tensão, obtido por osciloscópio, sobre o par de eletrodos da direção  $0^\circ$ , durante aplicação do pulso bipolar com o estimulador fabricado no CEB. À esquerda, encontra-se o pulso com duração total de 10 ms (5 ms cada fase) e com intensidade arbitrária; e à direita, a imagem em outra escala ilustrando a frequência de 0,5 Hz. Mesmas escalas da Figura 3.13.

A mudança de direção de aplicação do estímulo era feita manualmente, ou seja, o estimulador era ligado a um par de eletrodos, fazia-se a estimulação e contava-se o número de células que respondiam ao estímulo. A seguir, o estimulador era desligado e conectado ao outro par de eletrodos. O procedimento foi repetido para cada direção, para cada tipo de pulso (mono e bipolar) e para cada uma das três intensidades. Dessa maneira, foi obtida a porcentagem de células recrutadas em cada uma das direções (estimulação unidirecional), numa dada população. O recrutamento total nas três direções foi considerado como a soma do recrutamento em cada direção, contando-se apenas uma vez as células que respondiam a estímulos em mais de uma direção, de modo a evitar intersecção.

### 3.3.2.2 Estimulação multidirecional automática

O circuito de chaveamento permite a variação automática da direção de aplicação do  $E$  estimulatório, para que a estimulação nas três direções ocorra dentro de um período da ordem de milissegundos. Isto se dava, no caso da estimulação com pulso monopolar, por meio dos pulsos dos sinais de controle enviados pelo LabView™, os quais eram monopolares, e tinham frequência, duração e amplitude de 0,5 Hz, 5 ms e 5 V, respectivamente. Os sinais em cada direção eram defasados 10 ms entre si, ou seja, 5 ms se passavam entre o término do pulso em uma direção e o início do pulso na outra direção, totalizando 25 ms de aplicação dos estímulos dentro de um período de 2 s (Figura 3.15).

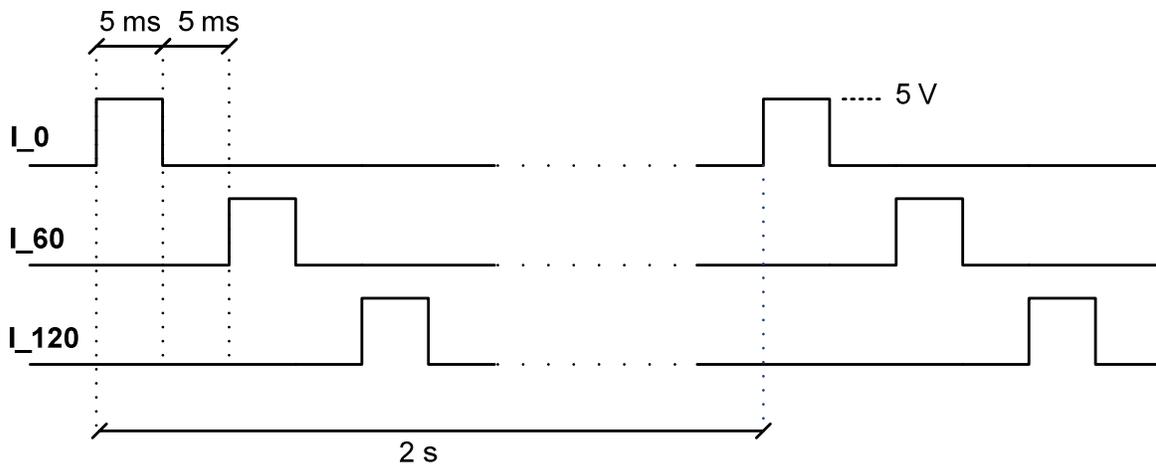


Figura 3.15 – Pulsos de controle da comutação dos relés enviados pelo LabView™ ao circuito de chaveamento.

Para que os sinais tivessem estas características, os parâmetros foram definidos no painel frontal, como mostrado na Figura 3.6. O controle “*Phase*” se refere ao atraso (em graus) de cada sinal em relação ao primeiro ( $0^\circ$  *pulse*). Considerando que o período é de 2 s ( $360^\circ$ ), 10 ms de atraso correspondem a  $1,8^\circ$ , e 20 ms a  $3,6^\circ$ . Para se ter um pulso de 5 V pico-a-pico partindo de 0 V, entrou-se com um valor de 2,5 V tanto em *Offset* como em *Amplitude* no painel frontal. O *duty-cycle* corresponde ao tempo em que o interruptor conduz dentro do período de 2 s (5 ms, ou 0,25% de 2 s).

Os pulsos de estimulação aplicados à câmara através dos relés possuíam, portanto, as mesmas características dos pulsos gerados pelo LabView™, com exceção da amplitude, que foi regulada em  $1,2 \times E_{TM}$  na fonte de tensão variável. Esta foi a única intensidade utilizada para a estimulação automática.

O tempo de aplicação dos três pulsos bipolares de estimulação (Figura 3.9) era de 30 ms, também dentro de um período de 2 s. Na estimulação com pulsos bipolares, também foi utilizada apenas uma intensidade:  $1,2 \times E_{TM}$ .

Durante a aplicação da estimulação multidirecional automática, tanto com pulsos monoplares quanto com bipolares, o protocolo experimental foi o mesmo que o utilizado com a estimulação manual: mediu-se  $E_T$  das células alinhadas a cada direção (mantendo conectado ao circuito de chaveamento apenas um dos pares de eletrodos de cada vez), calculou-se  $E_{TM}$  e aplicou-se a estimulação multidirecional automática com pulsos de amplitude de  $1,2 \times E_{TM}$ . Neste caso, dado o curto intervalo entre os pulsos nas três direções, não foi possível identificar quais células foram recrutadas em cada direção. A resposta da população de células à estimulação multidirecional, visualmente, era equivalente à resposta a apenas um estímulo. Portanto, computou-se apenas o recrutamento total.

Para testar se forma de onda afeta o recrutamento de células em um conjunto de populações de células, aplicou-se estimulação com pulsos mono e bipolares com amplitude proporcional ao valor de  $E_{TM}$  obtido com a respectiva forma de onda. Além disso, aplicou-se estimulação com pulso monopolar com amplitude de  $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ , e vice-versa (pulso bipolar com amplitude igual a  $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ ).

### 3.3.3 Estimativa do campo elétrico no interior da câmara de estimulação

O valor do campo elétrico  $E$  (V/cm) no centro da câmara (área de trabalho) foi estimado a partir da intensidade da corrente elétrica  $I$ , medida em osciloscópio entre os eletrodos (ou seja, na solução), de acordo com (Bassani *et al.*, 2006):

$$E = \frac{2 \cdot I}{b \cdot \pi \cdot \sigma \cdot h}$$

onde  $b$  é o raio da câmara (10 mm),  $h$  é o comprimento do eletrodo (igual à altura da câmara, 5 mm) e  $\sigma$  é a condutividade da solução fisiológica de Normal Tyrode ( $0,014 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Lima, 1999). Estima-se que no centro desta câmara, o campo seja praticamente uniforme, com variação menor que 1% em módulo e menor que  $1^\circ$  em direção (Bassani *et al.*, 2006).

### 3.3.4 Análise estatística dos dados

Os resultados (em valores absolutos ou porcentagens) estão apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média ou média acompanhada do intervalo de confiança para 95% (IC95%).

Os valores de  $E_{TM-BIPOLAR}$  e  $E_{TM-MONOPOLAR}$  obtidos no mesmo conjunto de populações foram comparados pelo teste  $t$  de *Student* com amostras pareadas.

A influência da intensidade de  $E$  estimulatório ( $1 \times E_{TM}$ ,  $1,2 \times E_{TM}$  e  $2 \times E_{TM}$ ) e da modalidade direcional da estimulação (unidirecional, multidirecional manual e multidirecional automática) sobre a porcentagem de recrutamento foi analisada por variância bifatorial, com posterior comparação pelo teste de Bonferroni. Este tipo de análise também foi usado para investigar a interação entre forma de onda do pulso e número de direções de aplicação do estímulo. Também se utilizou a análise de variância bifatorial seguida de teste de Bonferroni para investigar o recrutamento, com pulsos mono e bipolar, utilizando-se  $E_{TM-BIPOLAR}$  ou  $E_{TM-MONOPOLAR}$  como valor de referência.

Para caracterizar o recrutamento percentual de células em função de  $E$ , efetuou-se um ajuste não-linear por uma função sigmóide:

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(E50-X) \cdot n}}$$

na qual  $E50$  equivale à intensidade de  $E$  correspondente a um recrutamento de 50% e  $n$  ao coeficiente de Hill. Os valores mínimo e máximo foram fixados em zero e 100%, respectivamente.

Um valor de  $p < 0,05$  ou a não-sobreposição de IC95% para  $E50$  foi considerado indicativo de significância estatística.

A análise estatística foi realizada com o programa Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, California EUA).

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

### 4.1 SISTEMAS DE ESTIMULAÇÃO MULTIDIRECIONAL

#### 4.1.1 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulso monopolar

Como dito no capítulo anterior, o trem de pulsos para o controle da comutação dos relés era enviado ao circuito de chaveamento pelos canais ao0, ao1 e ao2 da placa de aquisição do LabView™, e o programa desenvolvido nesta plataforma era executado após a definição, no painel de controle, dos valores de frequência, duração, amplitude e atraso, e depois de ligadas as fontes de tensão (variável e de alimentação).

Na Figura 4.1, encontram-se os sinais obtidos pela leitura da tensão nos canais ao0 e ao1, que enviavam os pulsos aos relés correspondentes às direções de estimulação 0° e 60°, respectivamente. Como programado, os pulsos tinham duração de 5 ms e amplitude de 5 V, e o segundo pulso tinha um atraso de 10 ms em relação ao primeiro. O terceiro pulso, proveniente do canal ao2 (não mostrado na figura, devido a limitações do osciloscópio), apresentava um atraso de 20 ms em relação ao primeiro.

Sempre que um relé estava conduzindo, uma corrente circulava entre a fonte de tensão variável e a câmara de estimulação. Independentemente do relé, esta corrente sempre passava pelo resistor de precisão de 6,9  $\Omega$ , que estava em série com a fonte. Portanto, para poder visualizar ao mesmo tempo os três pulsos (um correspondendo a cada direção) no osciloscópio, bastava fazer a aquisição do sinal de tensão sobre o resistor. Além disso, durante os experimentos, o monitoramento de  $E$  no interior da câmara foi feito pela leitura deste sinal (o mesmo sinal na solução condutora no interior da câmara). Com base na lei de Ohm, aplicou-se uma tensão de 690 mV sobre o resistor para que circulasse na solução fisiológica uma corrente de 100 mA, que gera um  $E$  de 8,7 V/cm. Esse sinal, adquirido durante a aplicação dos três pulsos monopulares à câmara de estimulação, está ilustrado na Figura 4.2 (cada degrau, de 690 mV de amplitude, corresponde a uma direção). De acordo com a figura, o intervalo de tempo em que os pulsos são aplicados (em que ocorre a variação da direção) foi aproximadamente 26 ms. Esse acréscimo de 1 ms ao tempo de estimulação (que seria de 25 ms, considerando os valores especificados de duração e intervalo entre os pulsos) se deve à

comutação dos relés, cujos contatos podem levar até 2 ms para mudarem de estado, causando um ligeiro atraso em alguns casos. A frequência destes pulsos, assim como a frequência dos pulsos enviados pelo LabView™, era de 0,5 Hz (Figura 4.3).

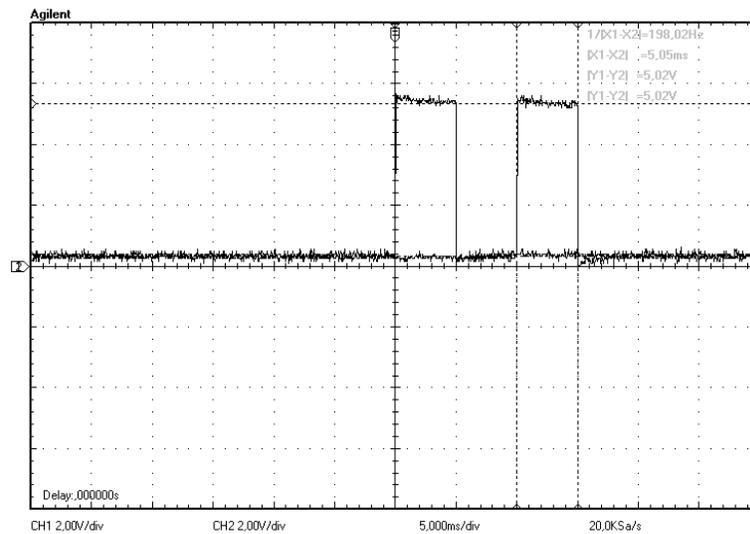


Figura 4.1 – Pulsos de controle enviados pelo programa feito em Labview™ aos relés conectados aos pares de eletrodos das direções 0° (pulso à esquerda) e 60° (pulso à direita). Este último só se iniciava 5 ms após o término do primeiro pulso (direção 0°). Escalas: 2 V/div e 5 ms/div.

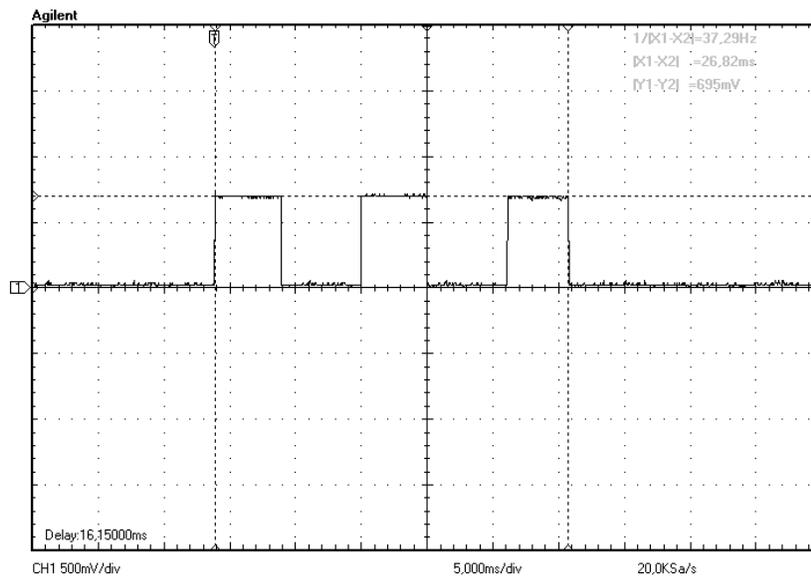


Figura 4.2 – Tensão sobre o resistor de precisão de 6,9Ω. Os pulsos possuem amplitude de 690 mV ( $I = 100$  mA). Escalas: 500 mV/div e 5 ms/div.

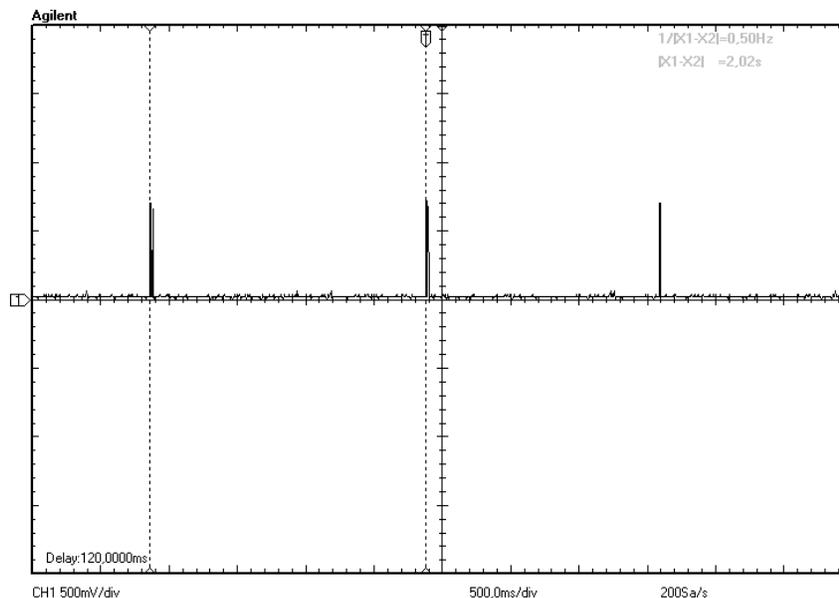


Figura 4.3 – Tensão sobre o resistor de precisão em uma escala de tempo comprimida (500 ms/div). Cada deflexão do sinal, com intervalo de 2 s, corresponde ao trio de pulsos mostrado na Figura 4.2.

#### 4.1.2 Sistema de estimulação multidirecional automática com pulso bipolar

Os pulsos para o controle da comutação dos relés, gerados nas portas configuradas para saída (RB0 a RB5) do microcontrolador PIC, eram monopolares, e tinham duração de 5 ms e amplitude de 5 V, assim como os pulsos gerados pelo LabView<sup>TM</sup>. Porém, de uma porta para a outra, havia um incremento de 5 ms no atraso (ao invés de 10 ms). Ou seja, assim que o pulso de uma porta terminava, imediatamente se iniciava o pulso da porta seguinte. Os sinais adquiridos em três portas diferentes estão ilustrados na Figura 4.4. Em (A), estão os dois pulsos que geram o pulso bipolar no par de eletrodos da direção 0° (portas RB0 e RB1) e, em (B), os pulsos que controlam a comutação dos relés correspondentes à fase positiva dos pulsos bipolares em 0° e 60° (portas RB0 e RB2).

Devido à maneira como foi feita a conexão dos relés para a geração do pulso bipolar, poderia ocorrer um curto-circuito na fonte de tensão variável caso dois relés conduzissem ao mesmo tempo. O fato dos pulsos de controle terem sido programados para se iniciarem imediatamente após o término do pulso anterior poderia tornar maior o risco da condução simultânea dos relés. Porém, isto não aconteceu, pois sua comutação criou um intervalo de tempo entre os pulsos de estimulação gerados. Foi necessário reduzir esse intervalo para evitar



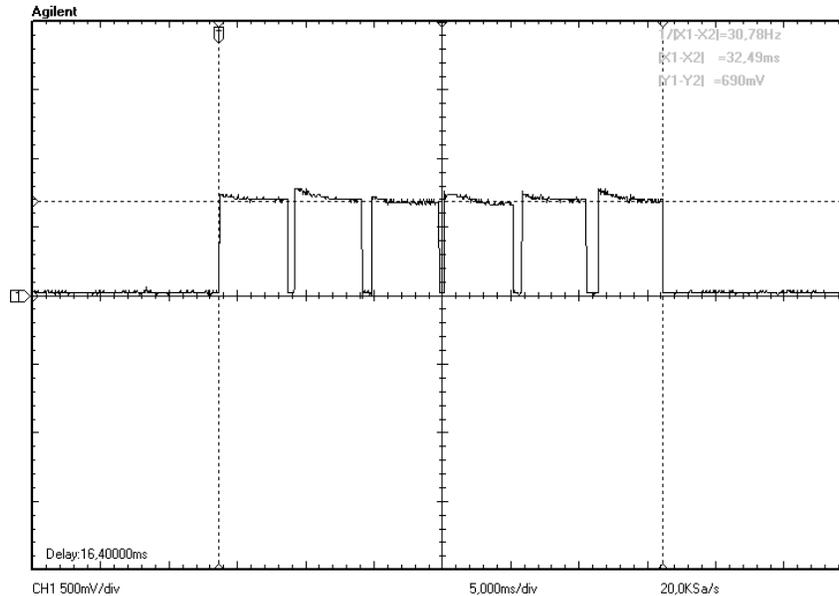


Figura 4.5 – Sinal de tensão aplicada sobre o resistor de precisão de  $6,9 \Omega$ , com amplitude de 690 mV. Cada dois pulsos correspondem a um pulso bipolar numa dada direção de estimulação. O pulso correspondente à fase negativa do pulso bipolar gerado no par de eletrodos é aqui visto positivo devido à posição do resistor no circuito. Escalas: 500 mV/div e 5 ms/div.

O pulso aplicado a cada par de eletrodos era, portanto, bipolar simétrico com duração total de 10 ms. A Figura 4.6 ilustra o pulso bipolar gerado no par de eletrodos de cada direção de estimulação, na qual é possível ver que há um intervalo de tempo da ordem de microssegundos entre as duas fases do pulso, resultante do efeito da comutação dos relés. Aparentemente, isto não afeta a resposta das células, como é possível verificar no item 4.2 deste capítulo, em que são apresentados os resultados de recrutamento obtidos com a estimulação das células. A amplitude destes pulsos (cerca de 40 V) é o valor que gerou uma corrente de 100 mA no interior da câmara e, por consequência, o valor de  $E$  de 8,7 V/cm usado para definir a população de células responsivas à estimulação. Já na Figura 4.7, está o mesmo sinal da Figura 4.6, mas em uma escala de tempo comprimida para permitir a visualização de um período completo de 2 s.

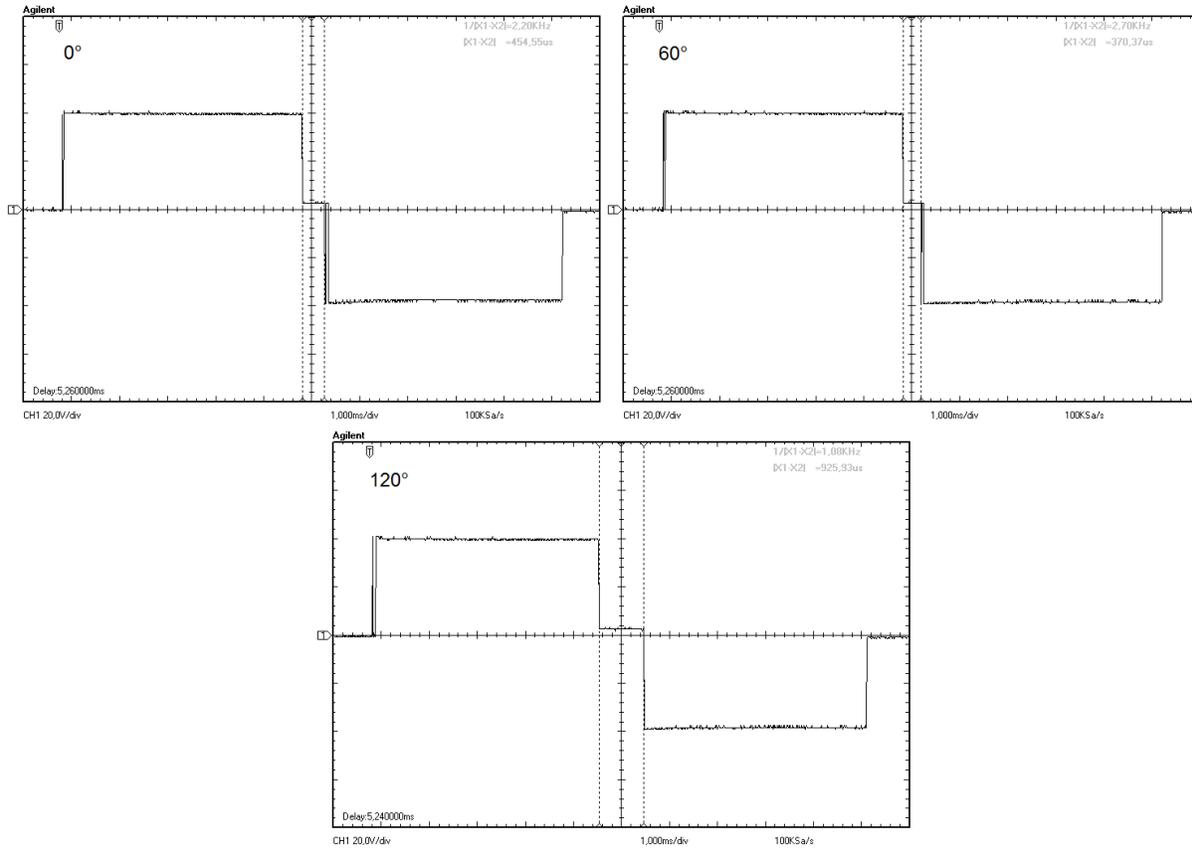


Figura 4.6 – Pulsos bipolares aplicados à câmara em cada direção de estimulação. Na direção 0°, o tempo decorrido entre fases positiva e negativa do pulso é de 454,55  $\mu$ s; na direção 60°, o tempo é de 370,37  $\mu$ s; e na direção 120°, 925,93  $\mu$ s. Escalas: 20 V/div e 1 ms/div.

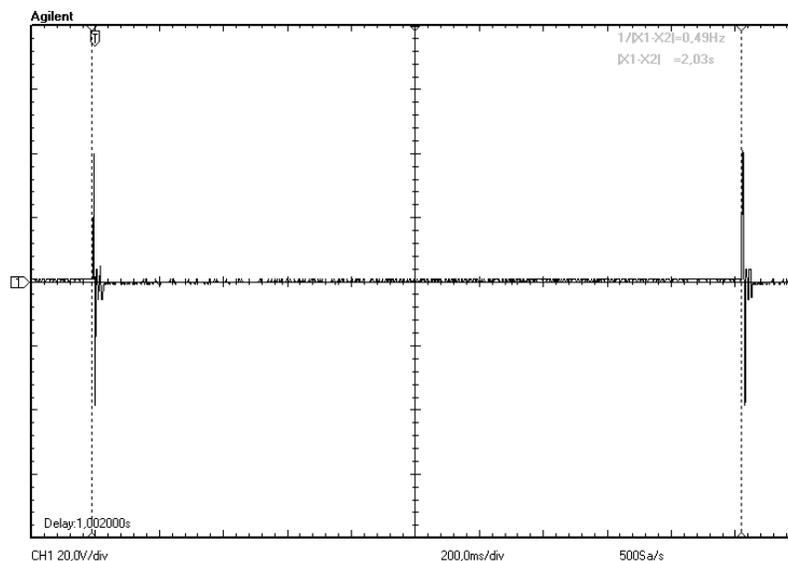


Figura 4.7 – Pulso bipolar sobre o par de eletrodos referente à direção 0°; frequência de 0,5 Hz (200 ms/div). Cada deflexão do sinal, com intervalo de 2 s, corresponde a um trio de pulsos bipolares.

## 4.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE POPULAÇÕES DE MIÓCITOS

### 4.2.1 Estimulação uni e multidirecional com pulso monopolar

#### 4.2.1.1 Estimulação multidirecional manual

Para estes experimentos, foram analisadas 36 populações (câmaras) compostas de 8 a 14 miócitos. O total de células recrutadas pela estimulação nas três direções corresponde ao somatório das células que responderam em cada direção individual, sem intersecção (ou seja, as células que responderam em mais de uma direção foram contadas apenas uma vez). Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2 e nas Figuras 4.8 e 4.9.

A análise de variância mostrou que, tanto a intensidade do estímulo, quanto o número de direções empregadas para estimulação, afetou significativamente o grau de recrutamento ( $p < 0,001$ ). Para a mesma intensidade de  $E$ , a estimulação multidirecional produziu maior recrutamento do que a unidirecional em qualquer nível de  $E$  ( $p < 0,001$ , teste de Bonferroni).

A porcentagem de células excitadas em uma única direção cresceu à medida que se aumentou a amplitude de  $E$ , passando de  $17,0 \pm 2,7\%$  com  $1 \times E_{TM}$  para  $74,1 \pm 3,9\%$  com  $2 \times E_{TM}$  ( $p < 0,001$ , Tabela 4.1). Considerando a soma dos recrutamentos nas três direções, o número de células excitadas aumentou mais que 100% quando a intensidade de  $E$  foi elevada em apenas 20% (de  $1 \times E_{TM}$  para  $1,2 \times E_{TM}$ ). Porém, a elevação adicional de  $E$  para  $2 \times E_{TM}$  produziu um aumento do recrutamento de apenas 14%, que não foi estatisticamente significativa provavelmente devido à proximidade do máximo recrutamento possível. Esta aparente saturação do efeito do aumento de  $E$  apenas no caso da estimulação multidirecional resultou em uma interação significativa entre intensidade e direção da estimulação ( $p < 0,0001$ ).

Tabela 4.1 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopulares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em 1 ou 3 direções (0, 60 e 120°). Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção.

Intensidade do estímulo	$1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$	$1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$	$2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$
Número de populações	12	15	9
Número de células na população	$8,3 \pm 1,1$	$10,7 \pm 1,2$	$13,9 \pm 0,1$
$E_{TM-MONOPOLAR}$ (V/cm)	$3,8 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
Recrutamento			
Estimulação em uma única direção	$1,3 \pm 0,1$ ( $17,0 \pm 2,7\%$ )	$4,0 \pm 0,2$ # ( $37,8 \pm 2,2\%$ )	$10,1 \pm 0,1$ # § ( $74,1 \pm 3,9\%$ )
Estimulação nas 3 direções	$3,3 \pm 0,4$ * ( $43,4 \pm 6,0\%$ )	$8,7 \pm 1,0$ * # ( $82,2 \pm 3,6\%$ )	$13,0 \pm 0,7$ * # ( $94,1 \pm 2,5\%$ )

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação intensidade  $\times$  modalidade direcional:  $F = 19,95$ ;  $GL = 2$ ;  $33$ ; b) intensidade:  $F = 54,68$ ;  $GL = 2$ ;  $33$ ; c) modalidade direcional:  $F = 319,9$ ;  $GL = 1$ ;  $33$ .

Teste de Bonferroni: \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,001$  vs.  $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ ; §  $p < 0,001$  vs.  $1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ .

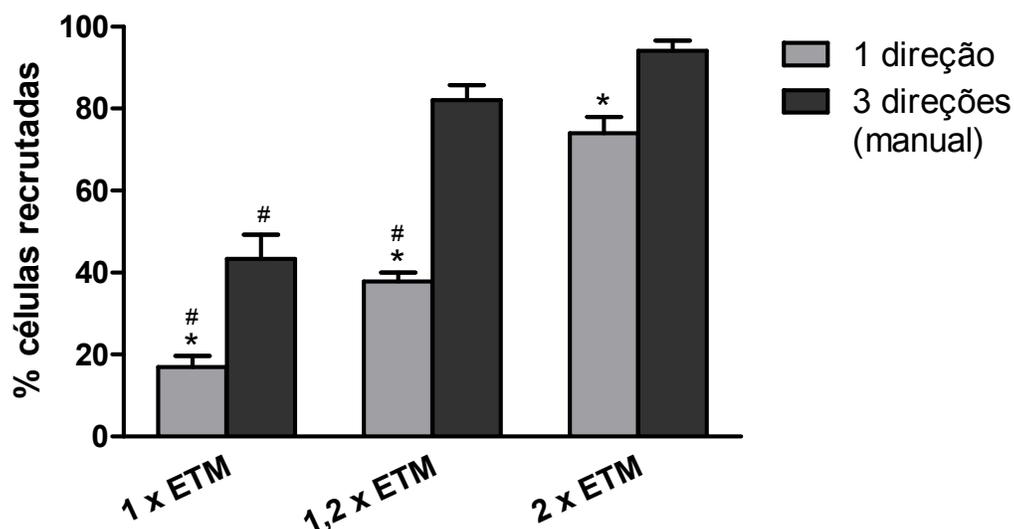


Figura 4.8 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual com pulso monopolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.1. \*  $p < 0,001$  uni vs. multidirecional; #  $p < 0,001$  vs.  $2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$  (teste de Bonferroni).

Quando se passou da estimulação uni para a multidirecional, (ou seja, quando se aumentou o número de direções em que o estímulo foi aplicado), com uma mesma intensidade de  $E$  ( $1 \times E_{TM}$ ,  $1,2 \times E_{TM}$  ou  $2 \times E_{TM}$ ), também houve o aumento do recrutamento. A estimulação multidirecional fez com o que o número de células excitadas praticamente dobrasse, porém, com  $2 \times E_{TM}$ , este aumento foi menor (de 74,1 para 94,1%) pelo fato da estimulação unidirecional com esta intensidade já produzir um recrutamento elevado (Tabela 4.1).

Pelos dados da Tabela 4.2, vê-se que, quanto maior a intensidade de  $E$ , mais células passam a responder a mais de uma direção, aumentando a intersecção. A análise de variância indica que há uma interação significativa ( $p < 0,0001$ ) entre intensidade e número de direções estimulatórias nas quais há recrutamento. O efeito da direção restringiu-se a esta interação, enquanto a intensidade apresentou um efeito isolado (i.e., independente da direção) que foi significativo ( $p < 0,0001$ ). Quando se aumentou a intensidade de  $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$  para  $2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ , a porcentagem de células excitadas em apenas uma direção diminuiu ( $p < 0,05$ ), enquanto que a quantidade de células que responderam a estímulos nas 3 direções, com a mesma variação de  $E$ , passou de nenhuma para 38,7% ( $p < 0,001$ , teste de Bonferroni). Na Figura 4.9 estão representados os recrutamentos em cada direção (e suas intersecções) de todas as câmaras estimuladas manualmente com  $1,2 \times E_{TM}$ .

Tabela 4.2 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopulares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em cada direção (0, 60 e 120°) e observou-se em quantas direções de aplicação do estímulo cada célula respondia. Os dados correspondem às intersecções da estimulação multidirecional manual.

Intensidade do estímulo	$1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$	$1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$	$2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$
$E_{TM-MONOPOLAR}$ (V/cm)	$3,8 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
<b>Recrutamento</b>			
Uma direção apenas	$0,9 \pm 0,0$ (11,9 $\pm$ 1,6%)	$1,8 \pm 0,1$ (17,2 $\pm$ 1,3%)	$0,2 \pm 0,1$ <sup>§</sup> & (1,6 $\pm$ 0,8%)
Duas direções	$0,2 \pm 0,1$ * (2,5 $\pm$ 1,0%)	$1,0 \pm 0,1$ (9,9 $\pm$ 1,4%)	$2,4 \pm 0,1$ * <sup>§</sup> (16,9 $\pm$ 2,4%)
Três direções	$0,0 \pm 0,0$ * (0,0 $\pm$ 0,0%)	$0,1 \pm 0,1$ * # (0,8 $\pm$ 0,6%)	$5,2 \pm 1,0$ * # <sup>§</sup> & (38,7 $\pm$ 8,0%)

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação intensidade  $\times$  número de direções: F= 27,92; GL = 4; 66; b) intensidade: F= 54,25; GL= 2; 66; c) número de direções: F= 1,438; GL= 2; 66.

Teste de Bonferroni: \*  $p < 0,05$  vs. uma direção apenas; #  $p < 0,05$  vs. duas direções; <sup>§</sup>  $p < 0,05$  vs.  $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ ; &  $p < 0,001$  vs.  $1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ .

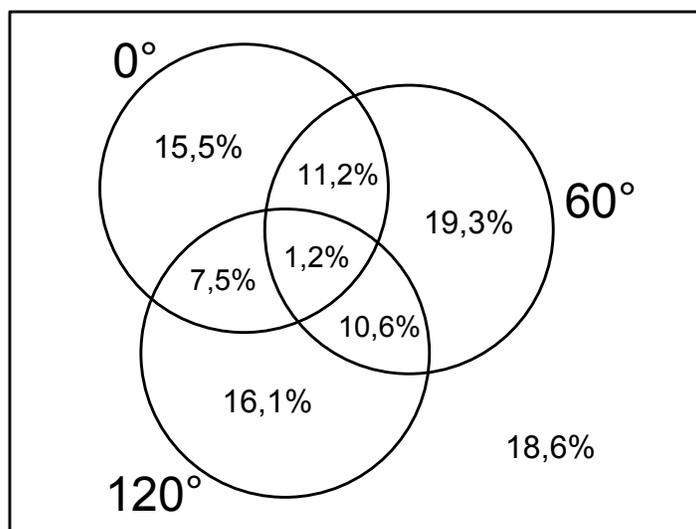


Figura 4.9 – Resposta de miócitos ventriculares a estimulação manual em três direções com pulso monopolar e  $1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ . Os dados correspondem à porcentagem de células que responderam ao estímulo em apenas uma, em duas ou nas três direções (intersecções). De um total de 161 células (15 populações, Tabela 4.1), 18,6% não responderam à estimulação em nenhuma direção.

#### 4.2.1.2 Estimulação multidirecional automática

Para avaliar a efetividade da estimulação multidirecional automática, utilizaram-se também, no mesmo conjunto de populações de miócitos usado para esta modalidade de estimulação, a estimulação unidirecional e a multidirecional manual. A análise de variância bifatorial indicou diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) entre os recrutamentos obtidos com as diferentes modalidades de estimulação (i.e., manual unidirecional, manual multidirecional e automática multidirecional), os quais estão apresentados na Tabela 4.3 e na Figura 4.10. Estes resultados foram obtidos a partir da estimulação de 20 populações (câmaras) e o  $E_{TM-MONOPOLAR}$  foi de  $3,8 \pm 0,1$  V/cm.

Durante a estimulação com pulsos monopulares com  $E$  de  $1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ , a porcentagem de miócitos recrutados numa única direção foi menor do que em três direções tanto no modo automático quanto no manual ( $p < 0,001$ , teste de Bonferroni). A estimulação automática em três direções, porém, proporcionou um recrutamento ainda maior que o recrutamento com a estimulação multidirecional manual ( $90,0 \pm 2,4\%$  vs.  $83,4 \pm 2,4\%$ , respectivamente;  $p < 0,01$ , teste de Bonferroni). Este resultado é interessante, pois é sugestivo de que a estimulação automática afete a sensibilidade das células ao estímulo elétrico por mais de um mecanismo (i.e., além de permitir estimulação em mais de uma direção).

Tabela 4.3 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos monopolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°) e manualmente em 1 ou 3 direções. Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção.

Intensidade do estímulo	$1,2 \times E_{TM-MONOPOLAR}$
Número de populações	20
Número de células na população	$15,3 \pm 1,4$
$E_{TM-MONOPOLAR}$ (V/cm)	$3,8 \pm 0,1$
Recrutamento	
Estimulação em uma única direção	$5,8 \pm 0,5$ ( $38,5 \pm 2,3\%$ )
Estimulação nas 3 direções (manual)	$12,5 \pm 1,1^*$ ( $83,4 \pm 2,4\%$ )
Estimulação multidirecional automática	$13,7 \pm 1,3^{* \#}$ ( $90,0 \pm 2,4\%$ )

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação forma de onda  $\times$  modalidade direcional:  $F = 0,102$ ;  $GL = 2$ ; 47,51; b) forma de onda:  $F = 0,244$ ;  $GL = 1$ ; 47,51; c) modalidade direcional:  $F = 701,5$ ;  $GL = 2$ ; 47,51.

Teste de Bonferroni: \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual.

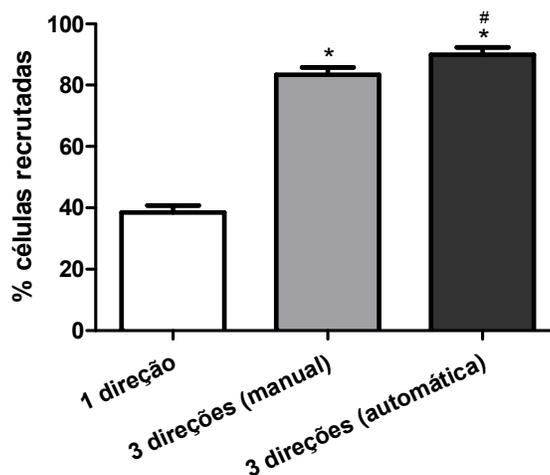


Figura 4.10 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulso monopolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$ ) da população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.3. \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni).

## 4.2.2 Estimulação uni e multidirecional com pulso bipolar

### 4.2.2.1 Estimulação multidirecional manual

A estimulação multidirecional manual com pulso bipolar e valores de  $E$  proporcionais ao limiar médio obtido para esta forma de onda ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) resultou em recrutamentos similares aos obtidos com pulso monopolar, como mostrado na Tabela 4.4 e na Figura 4.11, em comparação com a Tabela 4.1 e a Figura 4.8. Na estimulação com pulso bipolar também se observou que um maior número de células respondeu ao estímulo, em uma ou três direções, à medida que se aumentou a intensidade de  $E$  ( $p < 0,001$ , análise de variância). Entretanto, o aumento do recrutamento com três direções, quando se passou de  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$  para  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ , apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ , teste de Bonferroni), ao contrário do que ocorreu no caso do pulso monopolar. Ainda assim, esta diferença foi menor do que aquela observada para o aumento de  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$  para  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ , como se vê na Figura 4.11. Assim como observado para pulsos monopulares, a mudança da modalidade da estimulação de uma para três direções, a uma dada intensidade de estímulo ( $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$  ou  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ), também aumentou significativamente o recrutamento ( $p < 0,001$ , análise de variância). E com  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ , o aumento do recrutamento não foi proporcionalmente igual, porém, houve diferença estatística ( $p < 0,001$ ): passou de  $77,9 \pm 3,9\%$  em uma direção para  $98,0 \pm 1,4\%$  em três direções. Ainda à semelhança com os resultados de pulsos monopulares, análise de variância indicou interação entre modalidade de estimulação (número de direções) e intensidade do estímulo ( $p < 0,0001$ ).

A Tabela 4.5 e a Figura 4.12 mostram a intersecção do recrutamento, ou seja, a resposta a mais de uma direção estimulatória. Com pulso bipolar, também houve aumento da intersecção com o aumento da amplitude do  $E$  de estimulação, ou seja, mais células passaram a responder ao estímulo em mais de uma direção ( $p < 0,05$ , teste de Bonferroni). A análise de variância mostrou uma interação significativa ( $p < 0,0001$ ) entre intensidade e número de direções em que o estímulo é aplicado: o recrutamento em apenas uma direção foi reduzido ( $p < 0,05$ ) quando se aumentou a intensidade de  $E$   $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$  para  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ , enquanto que o número de células que respondeu a duas ou três direções aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) com esta mesma variação de  $E$  (Tabela 4.5).

Tabela 4.4 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a percentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em 1 ou 3 direções (0, 60 e 120°). Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção.

Intensidade do estímulo	$1 \times E_{TM-BIPOLAR}$	$1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$	$2 \times E_{TM-BIPOLAR}$
Número de populações	13	16	9
Número de células na população	10,3 $\pm$ 1,7	11,8 $\pm$ 1,3	14,0 $\pm$ 0,8
$E_{TM-BIPOLAR}$ (V/cm)	3,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1
Recrutamento			
Estimulação em uma única direção	1,6 $\pm$ 0,2 (17,3 $\pm$ 2,8%)	4,2 $\pm$ 0,1 # (38,2 $\pm$ 2,8%)	10,8 $\pm$ 0,1 # § (77,9 $\pm$ 3,9%)
Estimulação nas 3 direções	4,1 $\pm$ 0,8 * (42,8 $\pm$ 5,8%)	9,1 $\pm$ 0,9 * # (80,7 $\pm$ 3,9%)	13,7 $\pm$ 0,8 * # § (98,0 $\pm$ 1,4%)

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação intensidade  $\times$  modalidade direcional: F= 17,72; GL= 2; 35; b) intensidade: F= 55,14; GL= 2; 35; c) modalidade direcional: F= 307,4; GL= 1; 35.

Teste de Bonferroni: \* p < 0,001 vs. estimulação unidirecional; # p < 0,001 vs.  $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ; § p < 0,01 vs.  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ .

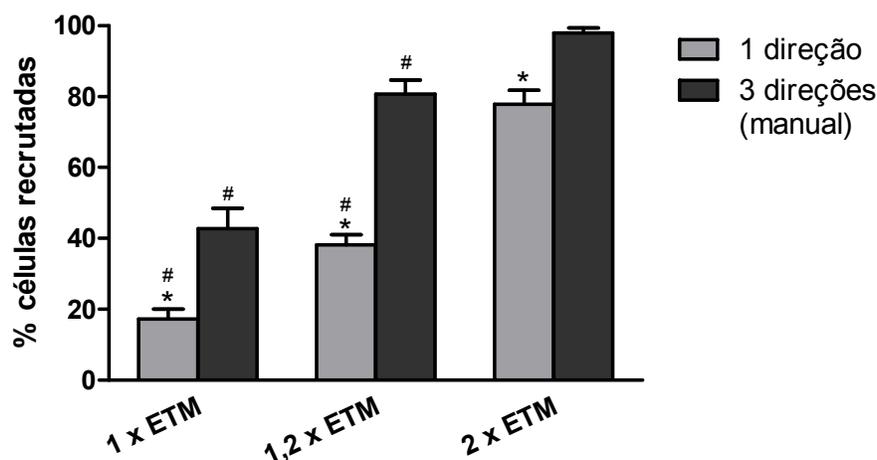


Figura 4.11 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (3 direções) manual com pulso bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.4. \* p < 0,001 uni vs. multidirecional; # p < 0,01 vs.  $2 \times E_{TM-BIPOLAR}$  (teste de Bonferroni).

Tabela 4.5 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada manualmente em cada direção (0, 60 e 120°) e observou-se em quantas direções de aplicação do estímulo cada célula respondia. Os dados correspondem às intersecções da estimulação multidirecional manual.

Intensidade do estímulo	$1 \times E_{TM-BIPOLAR}$	$1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$	$2 \times E_{TM-BIPOLAR}$
$E_{TM-BIPOLAR}$ (V/cm)	3,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1
<b>Recrutamento</b>			
Uma direção apenas	1,1 $\pm$ 0,2 (11,2 $\pm$ 2,0%)	1,9 $\pm$ 0,0 (17,2 $\pm$ 1,3%)	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>§ &amp;</sup> (2,5 $\pm$ 1,2%)
Duas direções	0,3 $\pm$ 0,0 (3,0 $\pm$ 1,5%)	1,2 $\pm$ 0,1 (9,9 $\pm$ 1,4%)	2,1 $\pm$ 0,1 * <sup>§</sup> (15,1 $\pm$ 2,2%)
Três direções	0,0 $\pm$ 0,0 * (0,0 $\pm$ 0,0%)	0,0 $\pm$ 0,0 * # (0,0 $\pm$ 0,0%)	6,1 $\pm$ 0,9 * # <sup>§ &amp;</sup> (45,2 $\pm$ 8,1%)

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação intensidade  $\times$  número de direções: F= 33,63; GL= 4; 68; b) intensidade: F= 70,88; GL= 2; 68; c) número de direções: F= 3,852; GL= 2; 68.

Teste de Bonferroni: \* p < 0,05 vs. uma direção apenas; # p < 0,05 vs. duas direções; § p < 0,05 vs.  $1 \times E_{TM}$ ; & p < 0,001 vs.  $1,2 \times E_{TM}$ .

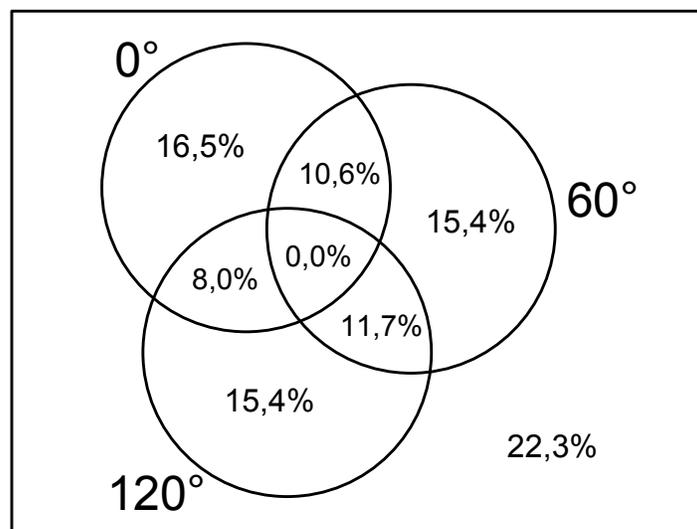


Figura 4.12 – Resposta de miócitos ventriculares a estimulação manual em três direções com pulso bipolar e  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$ . Os dados correspondem à porcentagem de células que responderam ao estímulo em apenas uma, em duas ou nas três direções (intersecções). De um total de 188 células (16 populações, Tabela 4.4), 22,3% não responderam à estimulação em nenhuma direção.

### 4.2.2.2 Estimulação multidirecional automática

Os dados obtidos com a estimulação multidirecional automática em 23 populações de miócitos com intensidade de  $1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$  e pulso bipolar estão apresentados na Tabela 4.6 e na Figura 4.13. O valor de  $E_{TM-BIPOLAR}$  obtido nessas populações foi  $2,5 \pm 0,1$  V/cm. A análise de variância mostrou que a modalidade de estimulação afetou significativamente o recrutamento ( $p < 0,0001$ ), tanto com relação ao número de direções (1 vs. 3), quanto à utilização de estimulação multidirecional manual vs automática (Tabela 4.6), como já observado para pulsos monoplares.

Tabela 4.6 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos bipolares de populações de miócitos ventriculares de rato. Os valores (média  $\pm$  erro padrão) referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°) e manualmente em 1 ou 3 direções. Neste último caso, foi somado o recrutamento em cada uma das direções, sem intersecção.

Intensidade do estímulo	$1,2 \times E_{TM-BIPOLAR}$
Número de populações	23
Número de células na população	$9,3 \pm 1,0$
$E_{TM-BIPOLAR}$ (V/cm)	$2,5 \pm 0,1$
Recrutamento	
Estimulação em uma única direção	$3,5 \pm 0,2$ (37,2 $\pm$ 1,8%)
Estimulação nas 3 direções (manual)	$7,7 \pm 0,9$ * (81,8 $\pm$ 3,1%)
Estimulação multidirecional automática	$8,3 \pm 0,9$ * # (88,2 $\pm$ 2,8%)

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação forma de onda  $\times$  modalidade direcional: F= 0,102; GL= 2; 47,51; b) forma de onda: F= 0,244; GL= 1; 47,51; c) modalidade direcional: F= 701,5; GL= 2; 47,51.

Teste de Bonferroni: \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual.

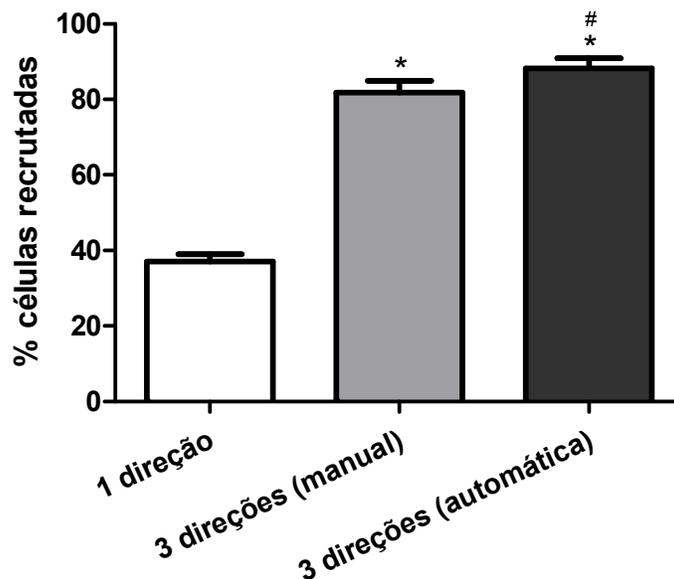


Figura 4.13 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulso bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) da respectiva população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.6. \*  $p < 0,001$  vs. Estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. Estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni).

### 4.2.3 Pulso monopolar $\times$ pulso bipolar

Embora resultados semelhantes tenham sido observados com pulsos estimulatórios mono e bipolares quando a intensidade do estímulo foi normalizada pelo campo limiar médio ( $E_{TM}$ ) para a respectiva forma de onda, como mostra a Figura 4.14 (onde são comparados os dados das Tabelas 4.3 e 4.6, cuja análise de variância indica interação e efeito da forma de onda não significativos, mas uma grande influência da modalidade de estimulação no recrutamento, com  $p < 0,0001$ ), o valor absoluto desse  $E$  dependeu significativamente da forma de onda. A Figura 4.15 mostra o valor de  $E_{TM}$  determinado para cada tipo de pulso em 46 populações de células. O  $E_{TM-MONOPOLAR}$  obtido foi de  $3,9 \pm 0,1$  V/cm, valor aproximadamente 22% maior que o do  $E_{TM-BIPOLAR}$  de  $3,2 \pm 0,1$  V/cm ( $p < 0,0001$ ; teste t de Student para amostras pareadas). Assim, nos resultados anteriormente apresentados, os valores absolutos de  $E$  estimulatórios utilizados nos experimentos com pulsos monopulares foram superiores aos utilizados com pulsos bipolares.

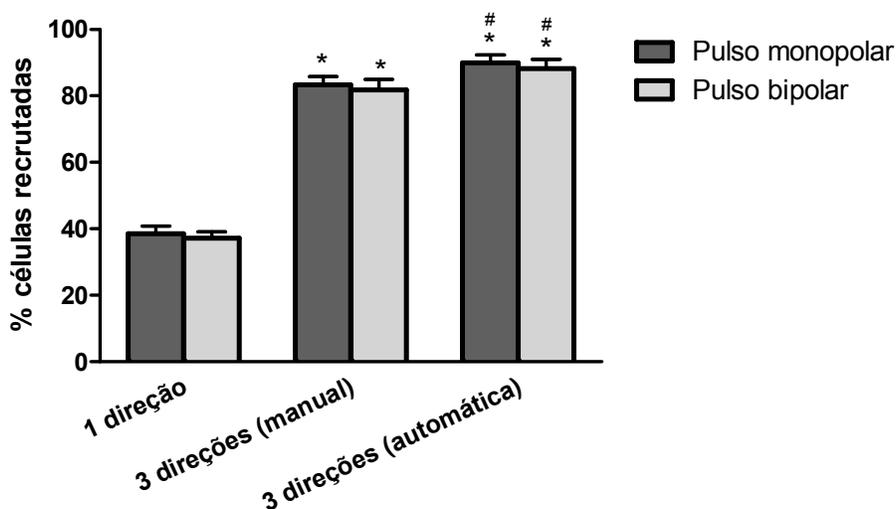


Figura 4.14 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação uni ou multidirecional (três direções) manual e automática com pulsos mono e bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $E_{TM-MONOPOLAR}$  com pulso monopolar e  $E_{TM-BIPOLAR}$  com pulso bipolar) da população de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados nas Tabela 4.3 e 4.6. Não há diferença estatística entre os recrutamentos obtidos com pulso monopolar e os obtidos com pulso bipolar, de acordo com a análise de variância. \*  $p < 0,001$  vs. estimulação unidirecional; #  $p < 0,01$  vs. estimulação multidirecional manual (teste de Bonferroni).

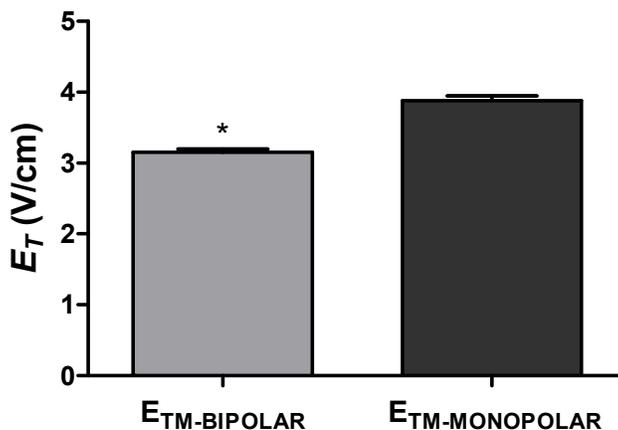


Figura 4.15 – Valores de  $E_{TM}$  (média  $\pm$  erro padrão) obtidos pela estimulação elétrica de um total de 46 populações (câmaras) de miócitos cardíacos isolados. Os valores de  $E_T$  correspondem ao menor valor de  $E$  capaz de gerar uma contração e foram obtidos de células alinhadas à direção de aplicação do estímulo, com duas formas de onda: pulsos mono e bipolares.  $E_{TM-BIPOLAR} = 3,2 \pm 0,1$  V/cm;  $E_{TM-MONOPOLAR} = 3,9 \pm 0,1$  V/cm. \*  $p < 0,0001$  vs.  $E_{TM-MONOPOLAR}$ .

Os dados da Tabela 4.7 e a Figura 4.16 mostram as diferenças no recrutamento quando se usou, no mesmo conjunto de populações de miócitos, os valores absolutos de  $E_{TM-MONOPOLAR}$  e  $E_{TM-MONOPOLAR}$  para pulsos mono e bipolares. A análise de variância com estes dados mostrou que tanto o  $E_{TM}$  como a forma de onda afetaram significativamente ( $p < 0,0001$ ) o recrutamento e que não houve interação entre as duas variáveis.

Estimulando-se uma população em três direções automaticamente com pulso monopolar de intensidade igual ao  $E_{TM-MONOPOLAR}$  ( $4,4 \pm 0,1$  V/cm), se obteve um recrutamento percentual (56%) estatisticamente comparável ao obtido com pulso bipolar de intensidade igual ao  $E_{TM-BIPOLAR}$  ( $3,3 \pm 0,1$  V/cm). Porém, este recrutamento com pulsos monopulares requereu uma intensidade de  $E$  aproximadamente 36% maior do que aquela para pulsos bipolares ( $p < 0,0001$ , teste  $t$  de Student para amostras pareadas). Por outro lado, quando se estimulou as populações com pulso bipolar de intensidade igual ao  $E_{TM-MONOPOLAR}$ , o recrutamento aumentou de 65% ( $E_{TM-BIPOLAR}$ ) para 93% ( $p < 0,001$ , teste de Bonferroni). O contrário aconteceu quando se utilizou pulso monopolar de intensidade igual ao  $E_{TM-BIPOLAR}$  ( $p < 0,001$ , teste de Bonferroni): o recrutamento caiu para 5% (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Recrutamento obtido com estimulação elétrica com pulsos mono e bipolares de populações de miócitos cardíacos ventriculares de rato. Os valores referem-se ao número de células que responderam ao estímulo com uma contração, e a porcentagem correspondente está apresentada entre parênteses (média  $\pm$  erro padrão). A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio obtido com pulsos mono ( $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$ ) e bipolar ( $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ) na respectiva população. A estimulação foi aplicada automaticamente em 3 direções (0, 60 e 120°).

Estimulação multidirecional automática com $1 \times E_{TM}$		
Número de populações	16	
Número de células na população	$17,3 \pm 1,0$	
$E_{TM-MONOPOLAR}$ (V/cm)	$4,4 \pm 0,1$	
$E_{TM-BIPOLAR}$ (V/cm)	$3,3 \pm 0,1$	
Recrutamento	Pulso bipolar	Pulso monopolar
$E_{TM-BIPOLAR}$	$11,1 \pm 0,8$ (65,3 $\pm$ 4,3%)	$0,8 \pm 0,3$ <sup>#</sup> (5,0 $\pm$ 2,2%)
$E_{TM-MONOPOLAR}$	$16,2 \pm 1,0$ * (93,1 $\pm$ 1,2%)	$9,6 \pm 0,9$ * <sup>#</sup> (56,3 $\pm$ 4,6%)

Análise de variância (F: F de Fisher; GL: graus de liberdade): a) Interação forma de onda x  $E_{TM}$ : F= 17,72; GL = 1; 30; b) forma de onda: F= 152,0; GL= 1; 30; c)  $E_{TM}$ : F= 202,1; GL= 1; 30. Teste de Bonferroni: \*  $p < 0,001$  vs.  $E_{TM-BIPOLAR}$ ; <sup>#</sup>  $p < 0,001$  vs. pulso bipolar.

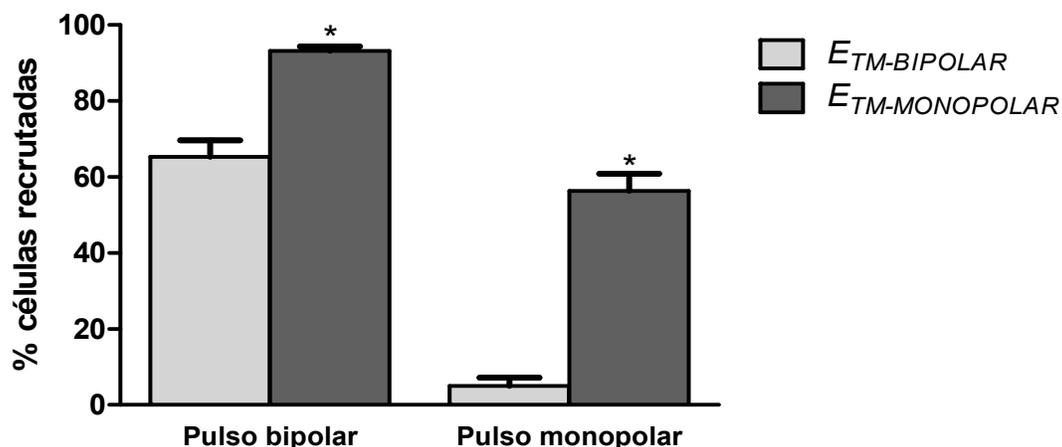


Figura 4.16 – Porcentagem de células recrutadas com a estimulação multidirecional automática com pulsos mono e bipolar. A intensidade do estímulo foi ajustada como um fator do campo limiar médio ( $1 \times E_{TM-MONOPOLAR}$  e  $1 \times E_{TM-BIPOLAR}$ ) das populações de miócitos isolados. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e correspondem aos valores mostrados na Tabela 4.7. \*  $p < 0,001$  vs.  $E_{TM-BIPOLAR}$  (teste de Bonferroni).

Na Figura 4.17 estão apresentadas as curvas de recrutamento celular em função da intensidade do  $E$  estimulatório aplicado com pulsos mono e bipolares em 16 populações de células (as mesmas nas quais foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.7). As curvas apresentaram paralelismo, com coeficiente de Hill de  $1,12 \pm 0,13$  (IC95%: 0,85 a 1,38) para pulso monopolar e  $1,11 \pm 0,12$  (IC95%: 0,88 a 1,34) para pulso bipolar. Porém, observou-se um desvio à esquerda para a curva obtida com pulsos bipolares. Para esta forma de onda, a intensidade de  $E$  para um recrutamento de 50% das células ( $2,97 \pm 0,04$  V/cm; IC95%: 2,88 a 3,06 V/cm) foi significativamente menor do que a determinada com pulsos monopulares ( $4,18 \pm 0,05$  V/cm; IC95%: 4,08 a 4,27 V/cm;  $p < 0,05$ ). Nesta figura, pode-se observar que se  $E$  iguais ao  $E_{50}$  obtido com pulsos bipolares forem utilizados com pulsos monopulares, o recrutamento cai para próximo de zero. Se, ao contrário, um  $E$  com intensidade igual ao valor  $E_{50}$  obtido com pulsos monopulares for utilizado com a forma de onda bipolar, o recrutamento é de praticamente 100% das células. Portanto, para uma dada intensidade do estímulo, o uso do pulso bipolar promoverá um maior recrutamento.

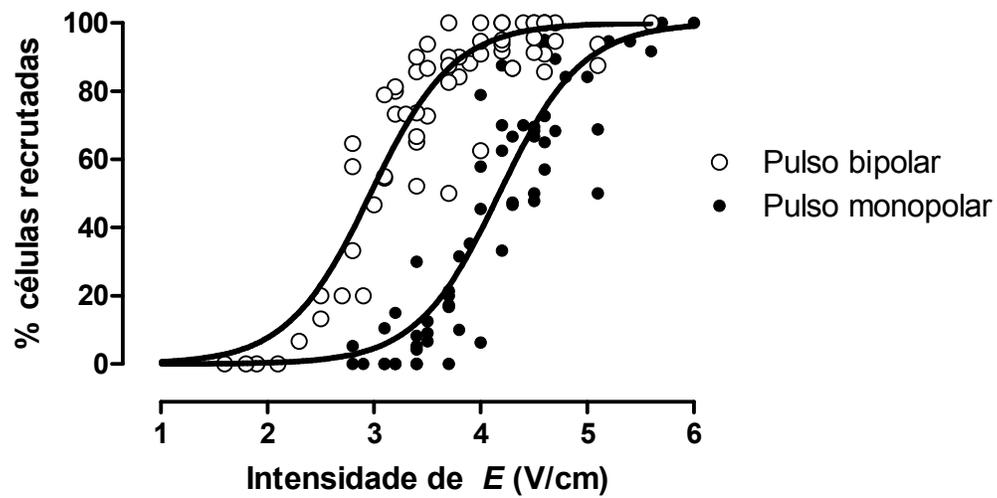


Figura 4.17 – Curvas de recrutamento celular em função da intensidade do campo elétrico ( $E$ ) estimulatório obtidas com estimulação multidirecional automática com pulsos mono e bipolares de miócitos ventriculares de rato. A intensidade de  $E$  foi variada entre 1,6 e 6,0 V/cm.

## CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 SISTEMAS DE ESTIMULAÇÃO MULTIDIRECIONAL AUTOMÁTICA

A instrumentação desenvolvida cumpriu os objetivos do projeto ao realizar a estimulação multidirecional de forma automática, com aplicação de estímulos nas três direções num período inferior à duração do PA no ventrículo do rato, que é cerca de 70 ms (Bassani *et al.*, 2004).

O LabView<sup>TM</sup>, utilizado para a estimulação multidirecional com pulso monopolar, permite variar facilmente os parâmetros do sinal, como frequência e duração do pulso, porém, exige o uso de um computador dedicado e uma placa de aquisição. Como o programa desenvolvido nesta plataforma não é de grande complexidade, foi possível substituí-lo por um micro-controlador PIC e reduzir o número de equipamentos utilizados. Dessa maneira, foi desenvolvido o estimulador multidirecional (Figura 3.10), que permite o uso de pulsos mono e bipolares, mas não a mudança rápida dos parâmetros do sinal (o que não foi necessário nos presentes experimentos). Para realizar qualquer mudança, é preciso abrir a caixa do equipamento e reprogramar o PIC. No entanto, existe a possibilidade de melhoramento futuro do sistema para permitir a variação de parâmetros, como duração e frequência de aplicação dos pulsos durante os experimentos.

O intervalo de tempo observado entre as duas fases dos pulsos bipolares gerados pelo sistema de estimulação multidirecional automática, que variou de 0,37 a 0,93 ms (devido aos atrasos na comutação dos relés), não interferiu no resultado, pois os valores de recrutamento seguiram o mesmo padrão observado na estimulação manual (na qual não houve intervalo na transição entre as duas fases do pulso bipolar). Além disso, a redução de limiar com esta forma de onda, em relação à monopolar, mostrou-se compatível com a observada quando não há intervalo entre as fases do pulso bipolar (presentes resultados; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Há evidência de que as duas fases podem ser separadas em até 6 ms sem que a forma de onda bipolar perca sua efetividade em reduzir o limiar estimulatório (Daubert & Sheu, 2008). Entretanto, há a opção de se utilizar um MOSFET (transistor de efeito de campo) como interruptor no circuito de chaveamento, substituindo o relé, para evitar o atraso causado pela comutação. Este componente, apesar de não ser tão simples como um relé e requerer componentes externos, tem um tempo de comutação mais curto e é mais estável na transição de um estado para o outro.

## 5.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE POPULAÇÕES DE MIÓCITOS

### 5.2.1 Recrutamento × amplitude do estímulo

Os resultados mostraram que, quanto maior a intensidade do  $E$  estimulatório, maior foi o número de células recrutadas, independente do número de direções de estimulação utilizadas e da forma de onda do estímulo.

A excitação de uma célula se dá com o disparo de um PA, o qual, na maioria dos casos, depende da abertura de canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de tensão presentes na membrana celular. Quanto maior a amplitude do estímulo, maior a variação de  $V_m$  e mais canais de  $\text{Na}^+$  se abrem. Quando  $V_m$  alcança um determinado valor (limiar), ocorre a abertura de um número de canais suficiente para causar o disparo do PA. Com o aumento da intensidade de  $E$ , um número maior de células sofre despolarização de membrana de magnitude suficiente para que o potencial limiar seja atingido, aumentando, conseqüentemente, o recrutamento na população de células.

A amplitude do estímulo que produz uma despolarização limiar da membrana pode variar de uma célula para outra, mesmo no mesmo tecido, e essas diferenças se devem a diversos fatores. Como mostrado por Gomes *et al.* (2001), o aumento de tamanho de miócitos cardíacos de mamíferos após o nascimento é acompanhado de redução do valor limiar de  $E$  estimulatório, o que foi atribuído às modificações pós-natais de tamanho e geometria celulares, que afetam o efeito de  $E$  sobre  $V_m$ . Além da dimensão, a orientação do eixo maior da célula em relação à direção do  $E$  aplicado faz com que haja diferenças nos valores de  $E_T$  (como discutido no item a seguir). Células de diferentes tamanhos e formas, e em posições variadas, em um mesmo tecido, requerem, portanto, intensidades diferentes de  $E$  para a excitação.

Outro possível fator envolvido na variabilidade de limiar é corrente de potássio  $I_{K1}$ , que contribui para a fase final de repolarização e para a estabilização do  $V_m$  diastólico. Esta corrente é um dos principais responsáveis pela baixa resistência diastólica da membrana em células ventriculares, o que lhe confere um papel na determinação da excitabilidade celular (Bers, 2001). Por exemplo, Golod *et al.* (1998) demonstraram que a despolarização crítica para excitação é 50% menor em células atriais do que em miócitos ventriculares de coelho, o que foi parcialmente atribuído à menor magnitude de  $I_{K1}$  no átrio e conseqüente maior impedância de entrada. Portanto, uma possível variação regional na magnitude de  $I_{K1}$  no ventrículo (que parece ocorrer em camundongos; Panamá *et al.*, 2007) poderia introduzir variabilidade adicional da excitabilidade das células das populações estudadas.

## 5.2.2 Recrutamento × direção

O aumento da amplitude do estímulo promove, além do aumento do recrutamento, o aumento da intersecção (Tabelas 4.2 e 4.5) do recrutamento obtido na estimulação multidirecional manual, ou seja, um número maior de células passa a responder a estímulos em mais de uma direção. Quando se fez a estimulação com  $1 \times E_{TM}$ , cerca de 11% das células responderam ao estímulo em apenas uma direção e nenhuma respondeu aos estímulos nas três direções. Com  $2 \times E_{TM}$ , o padrão se inverteu e a porcentagem de células que responderam ao estímulo em apenas uma direção caiu para cerca de 2%, enquanto aquela de células que responderam aos três estímulos aumentou para 40%. Isto provavelmente se deve ao recrutamento adicional de células cujo eixo maior se orientava em direções diferentes da direção do estímulo, para as quais o limiar é maior (Tung *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1993; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Assim, com o aumento da intensidade de  $E$ , foi possível recrutar miócitos com orientações diferentes da ótima.

O limiar estimulatório varia com a geometria da célula. A variação de  $V_m$  induzida por uma dada intensidade do  $E$  externo é maior quando este é aplicado na direção longitudinal do que na transversal ao eixo maior da célula, enquanto que, no limiar, embora os valores de  $E$  sejam diferentes, a despolarização da membrana é semelhante para estimulação em qualquer direção (Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). O modelo teórico proposto por Klee & Plonsey (1976), que analisa o papel da geometria e das dimensões da célula sobre a despolarização passiva da membrana, mostra que a variação de  $V_m$  depende fortemente dos comprimentos dos eixos maior e menor da célula, bem como do ângulo entre a direção de  $E$  e o eixo maior da célula. Quando  $E$  é aplicado transversalmente ao eixo maior, a variação de  $V_m$  é menor, logo, é preciso uma intensidade maior de  $E$  para produzir a mesma variação de  $V_m$  obtida quando este campo é aplicado na direção longitudinal. Knisley *et al.* (1993) propuseram que, no caso de estimulação longitudinal, a variação máxima de  $V_m$  seja uma função do produto da amplitude do estímulo e da metade do comprimento da célula; logo, quanto maior o comprimento, maior será a variação de  $V_m$ . Dessa forma, a estimulação na direção longitudinal faz com que  $V_m$  atinja seu valor limiar com menores valores de  $E$ . Posteriormente, Bassani *et al.* (2006) demonstraram que a razão dos valores de  $E_T$  para aplicação do estímulo em direções ortogonais poderia ser predito simplesmente pela razão dos valores de comprimentos dos eixos maior e menor da célula. Variabilidade intercelular no comprimento desses eixos, portanto, pode ser considerada como mais um fator que afeta o valor de  $E_T$  na população.

O recrutamento celular, portanto, depende não só da amplitude, como também da direção de aplicação do estímulo. Deve-se observar que um aumento do  $E$  estimulatório em

aproximadamente 65% (de  $1,2 \times E_{TM}$  para  $2 \times E_{TM}$ ), embora mais que duplicasse o recrutamento para estimulação unidirecional, resultou em aumento pouco significativo no caso da estimulação multidirecional, enquanto que um aumento de apenas 20% (i.e., de  $1 \times E_{TM}$  para  $1,2 \times E_{TM}$ ) praticamente duplicou o número de células excitadas, seja em uma ou em três direções (Tabelas 4.1 e 4.4). Esta diferença entre as estimulações uni e multidirecional foi decorrente da capacidade desta última modalidade de estimulação em recrutar um número bem maior de células com baixos valores de  $E$ . Isto acontece porque os miócitos que não foram excitados em uma dada direção responderam em outra direção, à qual o alinhamento de seu eixo maior era mais favorável. Pelo mesmo motivo, ao se considerar o recrutamento de um mesmo número de células, o simples fato de girar  $E$ , ou seja, de aplicá-lo em três direções diferentes, permitiu uma redução significativa de sua intensidade. Assim, no caso particular da estimulação multidirecional, foi possível recrutar 75-85% das células com uma intensidade de  $E$  40% menor ( $1,2 \times E_{TM}$ ) que aquela necessária para o mesmo recrutamento com apenas uma direção de estimulação ( $2 \times E_{TM}$ ).

Aplicar o estímulo em mais de uma direção, portanto, aumenta a eficiência do processo estimulatório, pois permite a redução significativa da amplitude do estímulo e, para uma dada intensidade de  $E$ , é possível recrutar mais células do que quando o estímulo é aplicado em uma única direção.

Com a estimulação multidirecional automática e  $1,2 \times E_{TM}$ , foram recrutadas 90% das células, independentemente da forma de onda utilizada. É interessante observar que esta porcentagem foi ligeira, mas significativamente maior que aquela obtida com a soma do recrutamento por estimulação unidirecional nas três direções (Tabelas 4.3 e 4.6). Isto indica que a estimulação multidirecional automática, por aplicar os estímulos em seqüência em um curto período de tempo, torna o processo de estimulação ainda mais eficiente. Esta maior eficiência poderia estar relacionada a uma redução do limiar de excitação das células, o que facilitaria a excitação de um número maior delas. Uma possível explicação para esta redução é o fenômeno da adição latente (somação temporal), que ocorre quando a membrana celular é previamente exposta a um estímulo sublimiar. Este estímulo causa uma despolarização passiva da membrana que, embora insuficiente para levar  $V_m$  ao valor limiar, persiste por algum tempo, decaindo com um curso temporal exponencial. Se um novo estímulo for aplicado antes do completo decaimento do potencial sublimiar, a despolarização gerada por ele se somará àquela remanescente do estímulo anterior, de modo que haverá maior probabilidade de que o valor limiar de  $V_m$  seja atingido, causando a excitação da célula (Aidley, 1998). O tempo que o potencial leva para voltar ao seu valor de repouso é determinado pela constante de tempo da

membrana (característica de sua resposta passiva: a membrana celular pode ser modelada como um circuito RC), que é cerca de 10 ms em ventrículo de mamífero (Sharma *et al.*, 2007). Assim, o estímulo em uma direção, que não excitasse determinada célula, poderia contribuir para o efeito da adição latente, facilitando a despolarização pelo próximo estímulo, aplicado em outra direção 5 ms após o término do estímulo anterior. Estima-se que, com este curto intervalo, cerca de 60% da despolarização passiva em resposta ao estímulo anterior ainda persistisse no instante de aplicação do próximo estímulo.

Bostock *et al.* (2005) mostraram que estímulos sublimiares aplicados a axônios de motoneurônios foram capazes de gerar um aumento transitório da excitabilidade da membrana, que alcançou seu máximo 5 ms após a aplicação do estímulo e durou cerca de 30 ms. Se estes dados podem ser extrapolados para miócitos ventriculares, seria esperado que os sucessivos estímulos aplicados durante a estimulação multidirecional automática, em um período de 25-30 ms, produzissem facilitação da excitação.

A superexcitabilidade por estimulação sublimiar, segundo Bostock *et al.* (2005), é devida tanto à resposta passiva (linear) da membrana (cuja amplitude é dependente daquela do estímulo), quanto à resposta não-linear devida à ativação de canais de íons ( $\text{Na}^+$ ) dependentes de tensão. Esta última ocorre quando  $V_m$  se aproxima do limiar, o que resulta na abertura de uma parte desses canais, mesmo que a corrente gerada não seja suficiente para disparar um PA. Sambelashvili *et al.* (2003) também concluíram, com base em modelamento matemático, que a resposta do tecido cardíaco à estimulação sublimiar não depende apenas da resposta passiva da membrana, mas também do efeito do potencial sobre canais iônicos. Os autores propõem que a redução de  $I_{K1}$  devida à despolarização gerada por estímulos sublimiares promova aumento da resistência da membrana, e assim contribuindo para aumentar a excitabilidade celular. Observe-se que a corrente através dos canais que medeiam  $I_{K1}$  depende essencialmente do gradiente eletroquímico do  $\text{K}^+$ , e estes canais apresentam forte retificação interna da corrente (Bers, 2001).

É importante lembrar que o tempo total de aplicação dos estímulos no modo automático (25 ms no caso de pulsos monopolares e 30 ms no caso de bipolares), inferior à duração do PA da preparação (60-70 ms; Bassani *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, de seu período refratário, foi escolhido para garantir que cada célula fosse excitada em uma única direção (intersecção nula). Portanto, interpretamos os presentes resultados como um aumento da excitabilidade da membrana produzido pela aplicação de  $E$  de intensidade sublimiar em outras direções.

Em resumo, a estimulação multidirecional automática produz um efeito adicional para incrementar o recrutamento excitatório: ela é capaz não apenas de recrutar células orientadas

em diferentes direções, como acontece com a estimulação multidirecional manual, como também é capaz de aumentar a sensibilidade das células a estímulos subseqüentes, possivelmente devido à estimulação com valores sublimiares de  $E$ . Este efeito parece contribuir para a maior efetividade excitatória dessa modalidade de estimulação.

### 5.2.3 Recrutamento × forma de onda

No presente trabalho, foi observado que, para uma dada amplitude de  $E$ , a estimulação elétrica, tanto unidirecional, quanto multidirecional (manual e automática) com pulsos bipolares promoveu um maior recrutamento em relação à estimulação com pulsos monopolares. Entretanto, quando a intensidade do estímulo foi normalizada pelo  $E_{TM}$  da forma de onda correspondente, não houve diferença estatisticamente significativa entre os recrutamentos obtidos com o uso de pulsos mono e bipolar. Isto parece decorrer da redução observada de  $E_T$  determinado com pulsos bipolares (vs. monopolares), de acordo com observações feitas em trabalhos anteriores (Jones *et al.*, 1987; Bassani *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2008), em que o  $E_T$  de uma dada célula é 20-25% maior quando o estímulo é monopolar, em comparação à estimulação com pulsos bipolares.

Jones *et al.* (1987) propuseram que o menor valor de  $E_T$  obtido com a forma de onda bipolar se deveria à ação condicionante da fase hiperpolarizante do pulso, de modo a favorecer a recuperação de canais de  $\text{Na}^+$  no estado inativado, o que aumentaria a disponibilidade destes canais para recrutamento a seguir, durante fase despolarizante do pulso recruta, facilitando a excitação da célula. Bassani *et al.* (2006) estimaram que a despolarização da membrana requerida para excitação de miócitos cardíacos é 25% menor para pulsos bipolares do que monopolares, independentemente da direção da estimulação, o que indica que a forma de onda afeta a excitabilidade celular, e não a polarização da membrana induzida por  $E$ . Assume-se que, durante a aplicação de um  $E$  externo, há um rearranjo de cargas no interior da célula que faz com que parte da membrana seja despolarizada (região mais próxima ao catodo) e parte seja hiperpolarizada (região mais próxima ao anodo). Uma ligeira despolarização sustentada pode levar à inativação de canais de  $\text{Na}^+$ , o que tenderia a aumentar  $E_T$ . Já na hiperpolarização ocorre o contrário, o que facilitaria a excitação subsequente por aumentar a disponibilidade de canais de  $\text{Na}^+$  recrutáveis (Aidley, 1998). Este fenômeno, chamado de acomodação do limiar, pode levar à estimulação por quebra de anodo: a redução do limiar durante a aplicação de um pulso hiperpolarizante de um pulso é tal que, dada a proximidade entre os valores limiar e de repouso de  $V_m$ , e o retorno não instantâneo de  $V_m$  ao seu valor de repouso, um PA pode ser

disparado no momento em que o estímulo é interrompido. Quando o estímulo é bipolar, ocorrem polarizações opostas nas mesmas regiões da membrana, ou seja, a região que na primeira fase do pulso é hiperpolarizada, na segunda fase é despolarizada, e vice-versa. Essa oposição de polaridades pode levar à estimulação por quebra de anodo durante a aplicação do pulso.

Os dados das curvas de recrutamento celular em função de  $E$  indicaram que, para uma dada intensidade do estímulo, o número de células recrutadas com pulso bipolar foi consistentemente maior do que com pulso monopolar. O valor de  $E_{50}$  ( $E$  para recrutamento de 50%) para pulsos bipolares foi cerca de 30% menor que o valor de  $E_{50}$  para pulsos monopolares. No entanto, exceto pelo desvio à esquerda, não se observou outras diferenças entre as curvas de recrutamento (e.g., coeficiente de Hill), o que é compatível com a idéia de que a forma de onda não afeta o processo fundamental de excitação, mas provavelmente modifica a sensibilidade da célula aos efeitos do estímulo elétrico.

Como citado anteriormente, para um recrutamento de aproximadamente 80%, a estimulação multidirecional permitiu uma redução de 40% na intensidade de  $E$  em relação à estimulação unidirecional, ou seja, uma variação de  $2 \times E_{TM}$  para  $1,2 \times E_{TM}$ . Com pulso monopolar, estes valores correspondem a 4,7 e 7,8 V/cm, respectivamente. No caso do pulso bipolar,  $1,2 \times E_{TM}$  corresponde a 3,8 V/cm (vs. 4,7 V/cm do monopolar). Assim, a estimulação multidirecional com pulso bipolar permitiria uma redução adicional de  $E$  em 20% para o mesmo grau de recrutamento. Portanto, para um recrutamento de aproximadamente 80% das células, a estimulação em três direções com pulso bipolar permitiria uma redução de  $E$  absoluto em mais de 50%, quando comparada com a estimulação monopolar em apenas uma direção (3,8 vs. 7,8 V/cm).

#### 5.2.4 Implicações clínicas

Neste trabalho, utilizou-se a estimulação de miócitos cardíacos isolados com valores de  $E$  próximos a  $E_T$ , ou seja, com valores cuja intensidade é cerca de 5% daquela necessária para causar morte celular (Tung *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2008). Se for possível extrapolar os presentes resultados para a desfibrilação, que envolve a aplicação de valores de  $E$  de alta intensidade a todo o coração, a abordagem estimulatória proposta neste trabalho poderia resultar em melhora significativa na eficiência do processo desfibrilatório.

Como dito anteriormente, durante a desfibrilação, regiões do coração podem ser expostas a  $E$  com intensidade superior a 100 V/cm (Yabe *et al.*, 1990), o que se esperaria ser letal a todas as células posicionadas longitudinalmente ao campo (Figura 6.1; Oliveira *et al.*, 2008).

Portanto, uma redução na amplitude do  $E$  requerido para a desfibrilação seria de grande importância para preservação da população de miócitos após a terapia elétrica. A desfibrilação multidirecional tornaria essa redução possível sem que houvesse perda no recrutamento, o que é de grande importância considerando que uma desfibrilação bem sucedida se dá quando uma quantidade crítica de células é despolarizada (Zipes *et al.*, 1975).

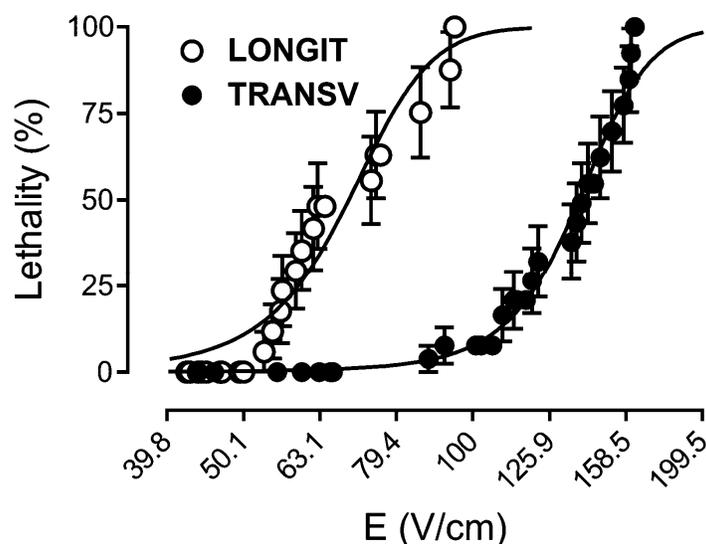


Figura 5.1 – Curvas de letalidade (probabilidade de letalidade em função do  $E$  estimulatório) para células posicionadas longitudinal e transversamente à direção de aplicação do estímulo. Os pontos são os valores médios e as barras representam o erro-padrão da média (Oliveira *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.* (2008) mostraram que as células são menos sensíveis à ação letal de  $E$  com pulsos bipolares: o fator de segurança (razão entre o valor de  $E$  com probabilidade de 50% de letalidade [ $EL_{50}$ ] e  $E_T$ ) é maior para pulsos bipolares do que monopulares, pois  $EL_{50}$  é aproximadamente 15% maior e  $E_T$  é cerca de 20% menor para a forma de onda bipolar. Isto indica que a forma de onda bipolar é superior à monopolar para desfibrilação e estimulação marcapasso, pois é mais eficiente na excitação elétrica, além de ser menos lesiva às células.

Se uma curva de recrutamento para valores desfibrilatórios de  $E$  seguisse o mesmo padrão das curvas de recrutamento levantadas no presente trabalho, o valor de  $E_{50}$  para pulsos bipolares continuaria sendo consideravelmente menor que o valor de  $E_{50}$  para pulsos monopulares, e seria ainda mais seguro por se afastar de valores letais às células. Nosso estudo, assim, corrobora resultados de outros trabalhos da literatura que também evidenciaram a superioridade do pulso bipolar em relação ao monopolar (Tang *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1995; Gliner *et al.*, 1995; Bassani *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2008).

Diversos outros trabalhos mostraram que dois ou mais choques aplicados em diferentes orientações são mais efetivos para a desfibrilação por reduzirem o limiar desfibrilatório (Bourland *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1986; Bardou *et al.*, 1988; Kerber *et al.*, 1994; Pagan-Carlo *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2002). Dois pulsos parcialmente sobrepostos e ortogonais entre si estimulam uma porção maior do miocárdio. Esta sobreposição permite também a geração de três vetores elétricos (um para cada pulso e outro correspondendo à sobreposição dos dois pulsos), sendo mais eficiente que dois pulsos seqüenciais separados, cujos vetores são mais afastados espacialmente (Kerber *et al.*, 1994). A modalidade de estimulação testada no presente trabalho envolveu o uso de pulsos temporalmente separados (portanto, sem sobreposição), aplicados em três direções. No entanto, a energia total aplicada foi maior que com apenas um par de pulsos. Como já demonstrado por Oliveira *et al.* (2008), a sensibilidade das células miocárdicas aos efeitos danosos do campo também é dependente da direção de aplicação de  $E$ . Como a faixa de intensidade de  $E$  utilizada neste trabalho foi muito menor do que a utilizada para desfibrilação, é importante que seja investigado futuramente se a provável redução do  $E$  efetivo para desfibrilação obtida com o presente método será suficiente para minimizar a lesão celular comumente resultante da aplicação de  $E$  de altas intensidades.

Exner *et al.* (1994) observaram em humanos que a combinação da forma de onda bipolar com pulsos seqüenciais durante a desfibrilação reduziu significativamente o limiar de desfibrilação quando comparado com o uso de apenas um estímulo com forma de onda bipolar ou apenas pulsos seqüenciais monopolares. Os experimentos realizados no presente trabalho mostraram que a estimulação multidirecional com pulso bipolar permite uma redução de 50% na intensidade de  $E$ . Uma redução nesta proporção durante uma desfibrilação faria com que a probabilidade de letalidade alcançasse valores próximos a zero para as células alinhadas com  $E$  (Figura 6.1). Para choques desfibrilatórios, uma pequena diminuição da intensidade de  $E$  pode reduzir marcadamente a produção de efeitos nocivos pelo choque. Portanto, a aplicação da técnica multidirecional na desfibrilação, especialmente em associação à forma de onda bipolar, pode se mostrar capaz de evitar que muitas células sofram lesões, por permitir alto recrutamento com menores valores de  $E$ . A potenciação da estimulação aparentemente devida à estimulação sub-limiar prévia durante a aplicação automática de estímulos em três direções durante poucas dezenas de milissegundos também poderia contribuir para aumento da efetividade. No entanto, ainda é necessário que esta possibilidade seja confirmada em preparações multicelulares e *in vivo*.

Mesmo existindo trabalhos que mostram que a desfibrilação é mais eficiente quando  $E$  é aplicado em várias direções, é preciso considerar que, no coração inteiro, as células estão

acopladas eletricamente e que isto pode influenciar a resposta da membrana celular ao  $E$  aplicado externamente, pois os resultados do presente trabalho foram obtidos em miócitos cardíacos isolados. Além disso, os danos causados pelos choques de alta intensidade que causam prejuízos às células (entre eles, a depressão contrátil, Soares, 2003) e dificultam uma nova desfibrilação, por outro lado, são capazes de inibir a onda fibrilatória, facilitando a desfibrilação (Al-Khadra *et al.*, 2000). Isto significa que os mecanismos responsáveis pela desfibrilação bem sucedida podem estar além do recrutamento de uma grande quantidade de células, assim, é preciso entender melhor estes mecanismos para buscar a técnica estimulatória ideal.

Outro fator a ser considerado é que a estimulação multidirecional requer um total de seis eletrodos, tornando-se necessária a redução de seu tamanho para melhor posicionamento e contato. Esta redução, porém, aumenta a densidade de corrente que pode lesar e provocar queimaduras do tecido em contato, principalmente quando se trata da desfibrilação, a qual envolve  $E$  elevados.

A lesão celular pode ocorrer não só durante a desfibrilação, mas também durante estimulação marcapasso do coração (que requer menores valores de  $E$ ) devido à geração de correntes elevadas próximo aos eletrodos. O desacoplamento elétrico que se estabelece no tecido lesionado pela estimulação contínua torna a excitação mais difícil por levar ao aumento do limiar (Sambelashvili *et al.*, 2004). Isto pode causar não apenas falhas na excitação do miocárdio, mas também a necessidade de aumento da intensidade do estímulo, o que agravará mais a lesão. Quanto maior a densidade de corrente do estímulo marcapasso, maior o desenvolvimento de fibrose (Seguí, 1990). Portanto, a estimulação multidirecional automática poderia ser uma importante alternativa para a estimulação marcapasso, com o intuito de se reduzir a amplitude do estímulo e, conseqüentemente, a incidência de lesão. Por outro lado, é importante considerar que o aumento do número de eletrodos estimulatórios poderia resultar em maior lesão miocárdica total, mesmo que o grau de lesão fosse relativamente menor em cada sítio de estimulação. Portanto, ainda são necessários futuros trabalhos sobre a aplicabilidade e possíveis benefícios ou prejuízos desta abordagem estimulatória.

Adicionalmente, a estimulação multidirecional pode ser utilizada em qualquer tipo de experimento no qual seja necessário estimular eletricamente células individuais ou populações de células. Em alguns casos, a faixa de tensão fornecida pelos estimuladores elétricos disponíveis comercialmente não é suficiente para estimulação, como, por exemplo, de células de pequenas dimensões (Gomes *et al.*, 2001) e quando há modificações na composição de soluções de perfusão. Nestes casos, a estimulação multidirecional facilitaria a excitação.

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES

No presente trabalho, analisou-se a relação entre direção, forma de onda e intensidade do estímulo na excitação de populações de miócitos cardíacos isolados orientados de maneira aleatória, a partir de instrumentação desenvolvida no laboratório que permite variar rapidamente a direção de aplicação do estímulo. Os resultados obtidos mostraram que a estimulação multidirecional é mais eficaz na excitação de células por possibilitar a redução da amplitude de  $E$  para um mesmo recrutamento celular (ou, em outras palavras, possibilitou um significativo aumento do número de células excitadas por uma dada amplitude de  $E$ ) em relação à estimulação unidirecional.

Se fosse realizada uma desfibrilação multidirecional, em combinação com a forma de onda bipolar, cuja superioridade sobre a monopolar já é bastante conhecida, a chance de sucesso da reversão da arritmia seria maior e ainda se reduziria o risco de lesão do tecido cardíaco. Porém, em altas intensidades, outras questões teriam que ser analisadas para o resultado positivo da desfibrilação multidirecional, como, por exemplo, o tamanho dos eletrodos.

A estimulação/desfibrilação com mais de uma direção de aplicação do estímulo é um tema já abordado em diversos trabalhos anteriores que mostram que esta técnica é capaz de excitar um maior número de células com um menor  $E$ . Contudo, o presente trabalho apresenta evidência inédita de que a estimulação multidirecional, além de recrutar células em diferentes direções, também é capaz de alterar a sensibilidade da célula ao estímulo, facilitando a excitação e tornando-se, assim, mais um fator de redução do  $E$  estimulatório. Esses resultados, portanto, podem ter importante impacto sobre o desenvolvimento de procedimentos de estimulação cardíaca (marcapasso e desfibrilatória) mais eficientes e de menor risco.

## CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDLEY, D. J. *The Physiology of Excitable Cells*. 4. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998. 477 p.

AL-KHADRA, A.; NIKOLSKI, V.; EFIMOV, I.R. The role of electroporation in defibrillation. *Circulation Research*, v. 87, n. 9, p. 797-804, out. 2000.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. *Cardiovascular disease statistics – 2006 update*. Disponível em: <<http://www.americanheart.org>>. Acesso em: 6 setembro 2008.

AVITALL, B.; PORT, S.; GAL, R.; McKINNIE, J.; TCHOU, P.; JAZAYERI, M.; TROUP, P.; AKTAR, M. Automatic implantable cardioverter / Defibrillator discharges and acute myocardial injury. *Circulation*, v. 81, n. 2, p. 1482-1487, mai. 1990.

BARDOU, A.L.; DEGONDE, J.; BIRKUI, P.J.; AUGER, P.; CHESNAIS, J.M.; DURIEZ, M. Reduction of energy required for defibrillation by delivering shocks in orthogonal directions in the dog. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, v. 11 (11 Pt 2), p. 1990-1995, nov. 1988.

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

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of Physiology*, v. 476, n. 2, p. 279-293, abr. 1994.

BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. Contribution of  $Ca^{2+}$  transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *American Journal of Physiology*, v. 282, n. 6, p. H2406-H2413, jun. 2002.

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

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

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

BERS, D.M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2. ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. 427 p.

BOSTOCK, H.; LIN, C. S.; HOWELLS, J.; TREVILLION, L.; JANKELOWITZ, S.; BURKE, D. After-effects of near-threshold stimulation in single human motor axons. *The Journal of Physiology*, v. 564, n. 3, p. 931-940, mar. 2005.

BOURLAND, J.D.; TACKER, W.A.; WESSALE, J.L.; KALLOK, M.J.; GRAF, J.E.; GEDDES, L.A. Sequential pulse defibrillation for implantable defibrillators. *Medical Instrumentation*, v. 20, n. 3, p. 138-142, mai./jun. 1986.

CHANG, M.; INOUE, H.; KALLOK, M.; ZIPES, D.P. Double and triple sequential shocks reduce ventricular defibrillation threshold in dogs with and without myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 8, n. 6, p. 1393-1405, dez. 1986.

CHEEK, E.R.; FAST, V.G. Nonlinear changes of transmembrane potential during electrical shocks. Role of membrane electroporation. *Circulation Research*, v. 94, n. 2, p. 208-214, fev. 2004.

CHEN, P.S.; CHA, Y.M.; PETERS, B.B.; CHEN, L.S. Effects of myocardial fiber orientation on the electrical induction of ventricular fibrillation. *The American Journal of Physiology*, v. 264 (6 Pt 2), p. H1760-H1773, jun. 1993.

CHENG, D.K.L.; TUNG, L.; SOBIE, E.A. Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. *The American Journal of Physiology*, v. 277 (1 Pt 2), p. H351-H362, jul. 1999.

DAHL, C.F.; EWY, G.A.; WARNER, E.D.; THOMAS, E.D. Myocardial necrosis from direct current councershock: effect of paddle electrode size and time interval between discharges. *Circulation*, v. 50, n. 5, p. 956-961, nov. 1974.

DAUBERT, J.P.; SHEU S.S. Mystery of biphasic defibrillation waveform efficacy, is it calcium? *Journal of the American College of Cardiology*, v. 52, n. 10, p. 836-838, set. 2008.

EISENBERG, M.S.; COPASS, M.K.; HALLSTROM, A.P.; BLAKE, B.; BERGNE, L.; SHORT, F.A.; COBB, L. A. Treatment of out-of-hospital cardiac arrest with rapid defibrillation by emergency medical technicians. *The New England Journal of Medicine*, v. 302, n. 25, p. 1379-1383, jun. 1980.

EXNER, D.; YEE, R.; JONES, D.L.; KLEIN, G.J., MEHRA, R. Combination biphasic waveform plus sequential pulse defibrillation improves defibrillation efficacy of a nonthoracotomy lead system. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 23, n. 2, p. 317-322, fev. 1994.

GARCIA, E.A.C. *Biofísica*. São Paulo, Brasil: Sarvier, 1998. 387 p.

GAZMURI, R.J.; WEIL, MH.; BISERA, J.; TANG, W.; FUKUI, M; McKEE, D. Myocardial dysfunction after successful resuscitation from cardiac arrest. *Critical Care Medicine*, v. 24, n. 6, p, 992-1000, jun. 1996.

GLINER, B.E.; LYSTER, T.E.; DILLION, S.M.; BARDY, G.H. Transthoracic defibrillation of swine with monophasic and biphasic waveforms. *Circulation*, v. 92, n. 6, p. 1634-1643, set. 1995.

GOLOD, D.A.; KUMAR, R.; JOYNER, R.W. Determinants of action potential initiation in isolated rabbit atrial and ventricular myocytes. *The American Journal of Physiology*, v. 274 (6 Pt 2), p. H1902–1913, jun. 1998.

GOMES, P.A.P.; BASSANI, R.A.; BASSANI J.W.M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during post-natal development. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 48, n. 6, p. 630-636, jun. 2001.

GRAY, R.A.; JALIFE, J. Ventricular fibrillation and atrial fibrillation are two different beasts. *Chaos*, v. 8, n. 1, p. 65-78, mar. 1998.

GREENE, H.L.; DIMARCO, J.P.; KUDENCHUK, P.J.; SCHEINMAN, M.M.; TANG, A.S.; REITER, M.J.; ECHT, D.S.; CHAPMAN, P.D.; JAZAYERI, M.R.; CHAPMAN, F.W.; *et al.* Comparison of monophasic and biphasic defibrillation pulse waveforms for transthoracic cardioversion. *The American Journal of Physiology*, v. 75, n. 16, p. 1135–1139, jun. 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HWANG, G.S.; TANG, L.; JOUNG, B.; MORITA, N.; HAYASHI, H.; KARAGUEUZIAN, H.S.; WEISS, J.N.; LIN, S.F.; CHEN, P.S. Superiority of biphasic over monophasic defibrillation shocks is attributable to less intracellular calcium transient heterogeneity. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 52, n. 10, p. 828-835, set. 2008.

IDEKER, R.E.; ZHOU, X.H.; KNISLEY, S.B. Correlation among fibrillation, defibrillation, and cardiac pacing. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, v. 18 (3 Pt 2), p. 512–525, mar. 1995.

JALIFE, J. Ventricular fibrillation: mechanisms of initiation and maintenance. *Annual Review of Physiology*, v. 62, p. 25-50, 2000.

JAYANTI, V.; ZVIMAN, M.M.; NAZARIAN, S.; HALPERIN, H.R.; BERGER, R.D. Novel electrode design for potentially painless internal defibrillation also allows for successful external defibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 18, n. 10, p. 1095-1100, out. 2007.

JONES, D.L.; KLEIN, J.G.; GUIRAUDON, G.M.; SHARMA, A.D.; KALLOK, M.J.; BOURLAND, J.D.; TACKER, W.A. Internal cardiac defibrillation in man: pronounced improvement with sequential pulse delivery in two different lead orientations. *Circulation*, v. 73, n. 3, p. 484-491, mar. 1986.

JONES, J.L.; LEPESCHKIN, E.; JONES, R.E.; RUSH, S. Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation. *The American Journal of Physiology*, v. 235, n. 2, p. H214-H222, ago. 1978.

JONES, J. L.; JONES, R. E.; BALASKY, G. Improved cardiac cell excitation with symmetrical biphasic defibrillator waveforms. *The American Journal of Physiology*, v. 253, (6 Pt 2), p. H1418-H1424, dez. 1987.

KATZ, A.M. *Physiology of the Heart*. 2 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1992. 697 p.

KERBER, R.E.; SPENCER, K.T.; KALLOK, M.J.; BIRKETT, C.; SMITH, R.; YOERGER, D.; KIESO, R.A. Overlapping sequential pulses: a new waveform for transthoracic defibrillation. *Circulation*, v. 89, n. 5, p. 2369-2379, mai. 1994.

KLEE, M.; PLONSEY, R. Stimulation of spheroidal cells. The role of cell shape. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 23, n. 4, p. 347-354, jul. 1976.

KNISLEY, S.B.; BLITCHINGTON, T.F.; HILL, B.C.; GRANT, A.O.; SMITH, W.M.; PILKINGTON, T.C.; IDEKER, R.E. Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. *Circulation Research*, v. 72, n. 2, p. 255-270, fev. 1993.

KRAUTHAMER, V.; JONES, J.L. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. *Life Sciences*, v. 60, n. 22, p. 1977-1985, 1997.

LARSEN, M.P.; EISENBERG, M.S.; CUMMINS, R.O.; HALLSTRON, A.P. Predicting survival from out-of-hospital cardiac arrest: a graphic model. *Annals of Emergency Medicine*, v. 22, n. 11, p. 1652-1658, nov. 1993.

LI, H.G.; JONES, D.L.; YEE, R.; KLEIN, G.J. Defibrillation shocks increase myocardial pacing threshold: na intracellular microelectrode study. *The American Journal of Physiology*, v. 260 (6 Pt 2), p. H1973-H1979, jun. 1991.

LIMA, K.A. *Efeito da Direção do Campo Elétrico Sobre o Limiar de Estimulação de Miócitos Ventriculares Isolados*. 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Saúde Brasil 2007: Uma análise da situação de saúde – Perfil de mortalidade do brasileiro*. Brasília, 2008.

OLIVEIRA, P.X. *Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato*. 2004. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OLIVEIRA, P.X.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Cytosolic  $Ca^{2+}$  accumulation in ventricular myocytes after stimulation with high-intensity electric fields (HEF). *Biophysical Journal*, v. 88 (suppl. 1), abstr 1514, 2005.

OLIVEIRA, P.X.; BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 55, n. 11, p. 2635-2642, nov. 2008.

PAGAN-CARLO, L.A.; ALLAN, J.J.; SPENCER, K.T.; BIRKETT, C.L.; MYERS, R.; KERBER R.E. Encircling overlapping multipulse shock waveforms for transthoracic defibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 32, n. 7, p. 2065–2071, dez. 1998.

PANAMÁ, B.K., McLERIE, M.; LOPATIN, A.N. Heterogeneity of  $I_{K1}$  in the mouse heart. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 293, n. 6, p. H3558-H3567, dez. 2007.

RANJAN, R.; THAKOR, N.V. Electrical stimulation of cardiac myocytes. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 23, n. 6, p. 812-821, nov./dez. 1995.

SAMBELASHVILI, A.T.; NIKOLSKI, V.P.; EFIMOV, I.R. Nonlinear effects in subthreshold virtual electrode polarization. *American Journal of Physiology*, v. 284, n. 6, p. H2368-H2374, jun. 2003.

SAMBELASHVILI, A.T.; NIKOLSKI, V.P.; EFIMOV, I.R. Virtual electrode theory explains pacing threshold increase caused by cardiac tissue damage. *American Journal of Physiology*, v. 286, n. 6, p. H2183-H2194, jan. 2004.

SEGUÍ, A. F. Maturation of the electrode-endocardium interface. *Revista Española de Cardiología*, v. 43, n. 2, p. 3-12, 1990.

SHARMA, V.; TUNG, L. Spatial heterogeneity of transmembrane potential responses of single guinea-pig cardiac cells during electric field stimulation. *The Journal of Physiology*, v. 542, p. 477–492, jul. 2002.

SHARMA, V.; QU, F.; NIKOLSKI, V.P.; DeGROOT, P.; EFIMOV, I.R. Direct measurements of membrane time constant during defibrillation strength shocks. *Heart Rhythm*, v. 4, n. 4, p. 478-486, abr. 2007.

SILVERTHORN, D.U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 816 p.

SOARES, G.S. *Comprometimento Contrátil do Tecido Cardíaco Isolado Após Estimulação com Campo Elétrico de Alta Intensidade*. 2003. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Unicamp, Campinas.

STROBEL, J.S.; KENKNIGHT, B.H.; ROLLINS, D.L.; SMITH, W.M.; IDEKER, R.E. The effects of ventricular fibrillation duration and site of initiation on the defibrillation threshold during early ventricular fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 32, n. 2, p. 521-527, ago. 1998.

TANG, A.S.; YABE, S.; WHARTON, J.M., DOLKER, M.; SMITH, W.M., IDEKER, R.E. Ventricular defibrillation using biphasic waveforms: the importance of phasic duration. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 13, n. 1, p. 207-214, jan. 1989.

TANG, A.S.; WOLF, P.D.; AFEWORK, W.M.; SMITH, W.M.; IDEKER, R.E. Three-dimensional potential gradient fields generated by intracardiac catheter and cutaneous patch electrodes. *Circulation*, v. 85, n. 5, p. 1857-1864, mai. 1992.

TANG, W.; WEIL M.H.; SUN S.; GAZMURI R.J.; BISERA J. Progressive myocardial dysfunction after cardiac resuscitation. *Critical Care Medicine*, v. 21, n. 7, p. 1046-1050, jul. 1993.

TEN TUSSCHER, K.H.; HREN, R.; PANFILOV, A.V. Organization of ventricular fibrillation in the human heart. *Circulation Research*, v. 100, n. 12, p. e87-e101, jun. 2007.

TOKANO, T.; BACH, D.; CHANG, J.; DAVIS, J.; SOUZA, J.J.; ZIVIN, A.; KNIGHT, B.P.; GOYAL, R.; MAN, K.C.; MORADY, F.; STRICKBERGER, S.A. Effect of ventricular shock strength on cardiac hemodynamics. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 9, n. 8, p. 791-797, ago. 1998.

TUNG, L. Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle. *Proceedings of the IEEE*, v. 84, p. 366-378, 1996.

TUNG, L.; SLIZ, N.; MULLIGAN, M.R. Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circulation Research*, v. 69, n. 3, p. 722-730, set. 1991.

VETTER, F.J.; SIMONS, S.B.; MIRONOV, S.; HYATT, C.J., PERTSOV, A.M. Epicardial fiber organization in swine right ventricle and its impact on propagation. *Circulation Research*, v. 96, n. 2, p. 244-251, fev. 2005.

YABE, S.; SMITH, W.M.; DAUBERT, J.P.; WOLF, P.D.; ROLLINS, D.L.; IDEKER, R.E. Conduction disturbances caused by high current density electric fields. *Circulation Research*, v. 66, n. 5, p. 1191-1203, mai. 1990.

XIE, J.; WEIL, M.H.; SUN, S.; TANG, W.; SATO, Y.; JIN, X.; BISERA, J. High-energy defibrillation increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation Research*, v. 96, n. 2, p. 683-688, jul. 1997.

ZHENG, X.; BENSER, M.E.; WALCOTT, G.P.; SMITH, W.M.; IDEKER, R.E. Reduction of the internal atrial defibrillation threshold with balanced orthogonal sequential shocks. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 13, n. 9, p. 904-909, set. 2002.

ZIPES, D.P.; FISCHER, J.; KING, R.M.; NICOLL, A. deB., JOLLY, W.W. Termination of ventricular fibrillation in dogs by depolarizing a critical amount of myocardium. *The American Journal of Cardiology*, v. 36, n. 1, p. 37-44, jul. 1975.

## ANEXO – PUBLICAÇÕES

1) FONSECA, A. V. S.; OLIVEIRA, P. X.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. *More Effective and Safer Cardiac Electric Stimulation Using Multidirectional and Biphasic Stimuli*. In: 53th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2009, Boston. Biophysical Journal, 2009. v. 96. p. 260a-260a.

2) FONSECA, A. V. S.; OLIVEIRA, P. X.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. *Estimulação multidirecional de células cardíacas: instrumentação e experimentação*. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008, Salvador. Anais CBEB 2008, 2008. p. 1319-1322.

- Este trabalho obteve o 1º lugar no Prêmio Cândido Pinto de Melo, oferecido pela Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica (SBEB) ao melhor trabalho de aluno apresentado no 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, realizado no período de 16 a 20 de novembro de 2008 na cidade de Salvador – BA.

3) FONSECA, A. V. S.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. *Estimulação de miócitos ventriculares com campos elétricos aplicados em diferentes direções*. In: XXIII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2008, Águas de Lindóia. Anais FeSBE 2008, 2008.

- Este trabalho recebeu Certificado de Honra ao Mérito por sua apresentação na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 20 a 23 de agosto de 2008.