



LUIZA NAIARA SIQUEIRA DO PRADO

**RELAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO ESTÍMULO E LESÃO DE MIÓCITOS CARDÍACOS
POR CAMPOS ELÉTRICOS DE ALTA INTENSIDADE**

***RELATION BETWEEN STIMULUS DURATION AND INJURY TO CARDIAC MYOCYTES
BY HIGH ELECTRIC FIELDS***

**CAMPINAS, SP
2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO**

LUIZA NAIARA SIQUEIRA DO PRADO

**RELAÇÃO ENTRE A DURAÇÃO DO ESTÍMULO E LESÃO DE MIÓCITOS CARDÍ-
COS POR CAMPOS ELÉTRICOS DE ALTA INTENSIDADE**

***RELATION BETWEEN STIMULUS DURATION AND INJURY TO CARDIAC MYOCYTES
BY HIGH ELECTRIC FIELDS***

Orientador: Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica, na área de Engenharia Biomédica.

Master dissertation presented to the Graduate Program in Electrical Engineering of the School of Electrical and Computer Engineering of the University of Campinas to obtain the degree of Master of Science in Electrical Engineering, in the field of Biomedical Engineering.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUIZA NAIARA SIQUEIRA DO PRADO E ORIENTADA PELO PROF. DR. PEDRO XAVIER DE OLIVEIRA

**CAMPINAS, SP
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P882r Prado, Luiza Naiara Siqueira do, 1989-
Relação entre a duração do estímulo e lesão de miócitos cardíacos por campos elétricos de alta intensidade / Luiza Naiara Siqueira do Prado. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Pedro Xavier de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Estimulação elétrica. 2. Eletroporação. 3. Miócitos cardíacos. 4. Morte celular. I. Oliveira, Pedro Xavier de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Relation between stimulus duration and injury to cardiac myocytes by high electric fields

Palavras-chave em inglês:

Electrical stimulation

Electroporation

Cardiac myocytes

Cell death

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Pedro Xavier de Oliveira [Orientador]

Rosana Almada Bassani

Alexandre de Assis Mota

Data de defesa: 31-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

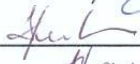
COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidata: Luiza Naiara Siqueira do Prado

Data da Defesa: 31 de janeiro de 2014

Título da Tese: "Relação Entre a Duração do Estimulo e Lesão de Miócitos Cardíacos por Campos Elétricos de Alta Intensidade"

Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira (Presidente):  _____

Prof. Dr. Alexandre de Assis Mota:  _____

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani:  _____

RESUMO

Apesar de a aplicação de campos elétricos de alta intensidade ser atualmente a única terapia disponível para interromper a fibrilação ventricular, esse processo pode causar lesões às células cardíacas, prejudicando sua contratilidade. Neste estudo, aplicamos pulsos elétricos de alta intensidade a miócitos isolados de ratos Wistar adultos. Obtivemos as curvas de letalidade por meio de análise de sobrevivência, que foram usadas para determinar a intensidade de campo necessária para matar 50% das células (EL50) e com esses valores obtivemos a curva de intensidade-duração (Ix_D) para letalidade para 10 durações diferentes: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 35 e 70 ms. Também obtivemos a curva Ix_D para excitação celular, por meio dos valores de média ± erro padrão da média para a intensidade de campo limiar de excitação para todas as durações, e obtivemos uma relação entre letalidade e excitação em função da duração do pulso, chamada de Fator de Segurança (FS), um indicador de segurança estimulatória. Essa curva foi determinada a partir da divisão entre os pontos das curvas Ix_D de letalidade e excitação. Observamos que quanto menor a duração de pulso, maior a intensidade de campo que causa morte celular. Ao contrário do que se esperava, o maior valor de FS não correspondeu à menor duração utilizada (0,1 ms), mas sim à duração de 0,5 ms. Como o limiar de desfibrilação foi descrito como dependente da duração do pulso aplicado, nossos resultados indicam que o uso de estímulos com duração mais curta – em vez da duração tipicamente usada na clínica, de 10 ms – pode diminuir as lesões celulares, e, portanto, aumentar a efetividade da desfibrilação.

Palavras-chave: estimulação por campos de alta intensidade, eletroporação, fator de segurança, miócitos cardíacos, morte celular.

ABSTRACT

Although high intensity electric fields application is currently the only effective therapy available to terminate ventricular fibrillation, it may cause injury to cardiac cells, impairing their contractility. In this study we applied high electric field pulses with different durations to isolated rat ventricular myocytes. We obtained lethality curves by survival analysis, which were used to determine the value of applied electric field necessary to kill 50% of cells (EL50) and plotted a strength-duration (IxD) curve for lethality with 10 different durations: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 10, 20, 35 and 70 ms. For the same durations we also obtained an IxD curve for excitation and established an indicator for stimulatory safeness, named Safety Factor (FS), as the ratio between the points on the IxD curve for lethality and the one for excitation. We found that the lower the pulse duration, the higher the electric field intensity required to cell death. Contrary to expectations, the highest FS value does not correspond to the lowest pulse duration but to the one of 0.5 ms. As defibrillation threshold has been described as duration dependent, our results imply that the use of shorter stimulus duration - instead of the one typically used in the clinic (10 ms) - may decrease electric cell damage, therefore increasing defibrillation effectiveness.

Keywords: *cardiomyocytes, lethal cell injury, electric field stimulation, electroporation, safety factor.*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	XI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXI
SUMÁRIO	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 ANIMAIS	8
3.2 SOLUÇÕES.....	8
3.3 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES	9
3.4 DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS	9
3.4.1 Set-up experimental	9
3.4.2 Câmara de perfusão.....	10
3.4.3 Sistema de microscopia	10
3.4.4 Estimulador Elétrico de baixa intensidade	11
3.4.5 Estimuladores Elétricos de alta intensidade	11
3.4.5.1 Circuito chaveador, flyback e capacitor de alta tensão	12
3.4.5.2 Circuitos de disparo 1 e 2.....	13
3.4.5.3 Circuitos de realimentação, controle da tensão e gerador de pulsos	14
3.4.6 Circuito comutador/sincronizador.....	17
3.4.7 Chave comutadora	17
3.4.8 Osciloscópio digital	18
3.5 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS	19
3.5.1 Dimensões celulares	19

3.5.2 Campo elétrico limiar (E_T)	19
3.5.3 Máxima variação do potencial de membrana induzida por E_T de 5 ms	19
3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	20
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3.7.1 Curvas de letalidade	22
3.7.2 Curvas intensidade-duração	23
3.7.1 Fator de Segurança (FS)	23
4 RESULTADOS	24
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	24
4.1.1 Sistema de microscopia	24
4.1.2 Chave comutadora	25
4.1.3 Estimulador de alta intensidade	25
4.1.3.1 Circuito gerador de alta tensão	25
4.1.3.2 Circuito de disparo	26
4.1.3.3 Circuito de realimentação	27
4.2 CURVAS INTENSIDADE X DURAÇÃO	28
4.3 FATOR DE SEGURANÇA.....	32
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	34
5.1 INSTRUMENTAÇÃO	34
5.1.1 Sistema de microscopia e chave comutadora	34
5.1.2 Estimulador de alta intensidade	34
5.2 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS	35
5.2.1 Comparação entre grupos	35
5.2.2 Curvas de letalidade	35
5.3 CURVAS INTENSIDADE X DURAÇÃO	37
5.3.1 I_{xD} para excitação	37
5.3.2 I_{xD} para letalidade	37
5.4 FATOR DE SEGURANÇA.....	38
5.5 RESUMO E CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS	41

*Dedico este trabalho à memória de Eruza Siqueira Rodrigues,
a minha mãe, Sena,
e a meu pai, Wilson.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a meus pais Sena Aparecida de Siqueira e Wilson Araújo do Prado, por todo o amor e apoio incondicionais. Agradeço principalmente por toda a compreensão e trabalho durante minha educação. Agradeço também a minha irmã, Tereza Carolina Siqueira do Prado, pelo carinho e por dividir comigo a vida inteira.

Ao professor Pedro Xavier de Oliveira, pela orientação, pela paciência e pelo apoio e trabalho contínuos. Agradeço também a todos os professores do Departamento de Engenharia Biomédica.

A todos os amigos, funcionários e técnicos do Departamento de Engenharia Biomédica, especialmente a Elizângela Souto de Oliveira e Carlos Alberto Lourenço, pelo apoio técnico e amizade.

Aos amigos Jair Trapé Goulart, Fernando Oliveira Andrade, Marcelo Zoccoler, Carlos Alexandre Ferri, Gustavo Tejerina e Ana Cholodovskis pela companhia e pelos excelentes momentos, também aos colegas de laboratório pelo apoio e pelos momentos de aprendizado e convivência, principalmente a Hugo Maia Milan, Marcelo de Almeida Viana, Natália Ferreira Oshiyama e Arnaldo Fim Neto.

Aos amigos que me acompanham há muito tempo, de perto e de longe, que dividem comigo felicidades e tristezas, em especial a Caroline Barbosa Farias Mourão, Pamela Santiago Hilario, Juliana Müller, Maryana Moura Xavier, Rodrigo de Souza Macedo Diniz, Lucas Cusinato Santos; a Raphael Vicente Rosa pelo apoio, companhia e amizade durante os anos de mestrado, e também aos novos, porém grandes amigos, Samira El Saifi, Juliana Soares Poloni e Leandro Infantini.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, concedido na forma de bolsa de estudos.

A todos que me apoiaram e ajudaram, contribuindo de alguma forma à realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ilustração esquemática dos poros na bicamada lipídica que compõe a membrana celular: poros hidrofóbicos não permitem a passagem de íons e moléculas polares e poros hidrofílicos permitem (modificado de Oliveira, 2004).	4
Figura 3.1 – <i>Set-up</i> experimental: 1) Estimulador de Baixa Intensidade (EBI); 2) Estimulador de Alta Intensidade (EAI); 3) Circuito comutador ou chave comutadora; 4) Sistema de microscopia.	10
Figura 3.2 - Sistema de microscopia: 1) Iluminação incandescente com difusor; 2) Câmara de perfusão com células; 3) Charriot com ajuste de foco; 4) Objetiva; 5) WebCam com conexão USB.	11
Figura 3.3 – Diagrama em blocos do sistema do Estimulador de Alta Intensidade.	12
Figura 3.4 –Circuito de geração de alta tensão do Estimulador de Alta Intensidade.	13
Figura 3.5 – Circuitos de disparo sobre a câmara de perfusão (A) e descarga do capacitor sobre resistor (B).	14
Figura 3.6 – Circuito de transformação da tensão para faixa de operação linear do transistor do opto acoplador, para realimentação.	15
Figura 3.7 – Circuito de controle do nível de tensão, via microcontrolador, a partir do circuito de realimentação.	15
Figura 3.8 – Fluxograma em que se baseia a programação do microcontrolador, para controle da tensão armazenada no capacitor.	28
Figura 3.9 – Esquema da chave utilizada para alternar entre os estimuladores de alta e baixa intensidade.	29
Figura 3.10 – Circuito de comando do servo motor acoplado à parte móvel da chave comutadora.	30
Figura 3.11 – Fluxograma do protocolo experimental.	33
Figura 4.1 – Sistema de microscopia desenvolvido.	24
Figura 4.2 – Chave comutadora: A) Entrada do Estimulador de Baixa Intensidade; B) Entrada do Estimulador de Alta Intensidade; C) Saída de pulsos para a câmara de perfusão; D) Servo motor.	25

Figura 4.3 – Carregamento do capacitor de alta tensão até 1,5 kV. A seta indica o momento de acionamento do circuito de descarga.	26
Figura 4.4 – Pulso de 0,1 ms, tensão de 100 V. A largura total do topo do pulso é de 114 μ s.	26
Figura 4.5 – Pulso de 0,5 ms, tensão de 98,7 V. A largura total do topo do pulso é de 520 μ s.	27
Figura 4.6 – Pulso de 1 ms, tensão de 99,8 V. A largura total do topo do pulso é de 0,99 ms.	27
Figura 4.7 – Resposta do circuito de realimentação ao carregamento do capacitor até 1,5 kV.	28
Figura 4.8 – Divisão dos valores das formas de onda obtidas nas saída de alta e baixa tensão.	28
Figura 4.9 – Curva IxD para excitação. Os círculos indicam a média e as linhas verticais, o erro padrão da média.	30
Figura 4.10 – Curvas obtidas a partir do ajuste sigmoide da tabela de probabilidade de letalidade para o campo E. As linhas verticais indicam o erro padrão da média.	31
Figura 4.11 – Curva IxD para a letalidade ajustada à equação modificada de Krassowska <i>et al.</i> (2003) ; $R^2 = 0,99$. Pontos indicam o valor médio de EL50 e as barras verticais indicam o erro padrão.	32
Figura 4.12 – Curva do Fator de Segurança: ajuste aos pontos obtidos por divisão ponto a ponto entre as curvas IxD de letalidade e de excitação. Os pontos indicam o valor da divisão e os traços indicam os limites superior (em azul – limite superior EC50/ limite inferior do valor médio da excitação para a respectiva duração) e inferior (em vermelho – limite inferior EC50/ limite superior do valor médio da excitação para a respectiva duração) do intervalo de confiança de 95% (IC95).	33
Figura 5.1 – Pontos da curva IxD para letalidade ajustados pela equação de Weiss-Lapique (linha contínua, $R^2 = 0,94$) e pela equação modificada de Krasowska <i>et al.</i> (2003) (linha tracejada, $R^2 = 0,99$).	38
Figura 5.2 – Curvas do Fator de Segurança obtidas por divisão entre pontos das curvas IxD para letalidade e excitação (linha contínua) e por análise de sobrevivência dos valores de campo letal em vezes o limiar de excitação (linha tracejada).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1 - Valores (média \pm erro padrão da média) do campo elétrico limiar para 5 ms (E_T), da máxima variação potencial transmembrana induzida por este campo (ΔV_T), dimensão do eixo menor da célula (2a) e dimensão do eixo maior da célula (2c).	29
Tabela 4-2 – Valores (média \pm erro padrão da média) e intervalo de confiança de 95% (IC95) para EL50 (valor de E correspondente à probabilidade de letalidade igual a 0,5), coeficiente de Hill (n) e R^2 para as curvas de análise de sobrevivência para a probabilidade de letalidade.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2a	Largura da célula
2c	Comprimento da célula
AEC	Acoplamento excitação-contração
A/D	Conversor analógico-digital
CEB	Centro de Engenharia Biomédica
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
C_r	Cronaxia
E	Campo elétrico
EAI	Estimulador de Alta Intensidade
EBI	Estimulador de Baixa Intensidade
EL50	Campo elétrico correspondente a probabilidade de 0,5
EPM	Erro padrão da média
E_{rh}	Reobase
E_T	Campo elétrico limiar de excitação
FS	Fator de Segurança
FV	Fibrilação ventricular
HEPES	Ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N''-2 etano-sulfônico
IGBT	<i>Isolated Gate Bipolar Transistor</i>
IxD	Intensidade-duração
KREBS	Solução de Krebs-Henseleit
MOSFET	<i>Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor</i>
NT	Solução de Tyrode normal
PWM	<i>Pulse-Width Modulation</i>
PA	Potencial de Ação
TBJ	Transistor Bipolar de Junção
TyrCl	Solução de Tyrode para isolamento de células
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
ΔV_m	Varição do potencial transmembrana

ΔV_T	Varição de potencial transmembrana induzida pelo campo elétrico limiar
V_m	Potencial transmembrana

1 INTRODUÇÃO

O coração é um órgão que tem como função bombear o sangue para os pulmões e para os tecidos e órgãos, mantendo o fluxo sanguíneo em todo o sistema vascular. Em mamíferos, é constituído por duas bombas distintas, separadas por septos. Cada bomba é composta por duas câmaras, um átrio e um ventrículo, que se comunicam por válvulas acionadas por diferença de pressão. Os átrios armazenam o sangue que vai para os ventrículos e durante a sístole sofrem contração que ajuda a forçar a passagem do sangue através das válvulas. O sangue bombeado pelo ventrículo direito através da artéria pulmonar recebe oxigênio por meio de trocas gasosas nos alvéolos pulmonares e retorna pela veia pulmonar, que entra no átrio esquerdo. O ventrículo esquerdo bombeia o sangue, então, para a circulação sistêmica pela artéria aorta. O sangue circula através dos vasos que irrigam os tecidos e órgãos periféricos transportando oxigênio e nutrientes, e também serve como via de transporte dos resíduos metabólicos que serão eliminados, e retorna ao coração pelas veias cava superior e inferior (Guyton & Hall, 2006).

A função bombeadora de sangue é baseada em mecanismos que mantêm a ritmicidade e sincronismo dos batimentos cardíacos. As células marca-passo no nódulo sinoatrial, em condições normais, são a origem dos estímulos elétricos (potenciais de ação) que desencadeiam a contração cardíaca. Esses estímulos são propagados por caminhos específicos (vias intermodais, feixe de His e fibras de Purkinje) e sofrem mudanças de velocidade de condução para que a contração ventricular ocorra a partir do ápice na direção das artérias pulmonar e aorta, que são conectadas à base do coração (Guyton & Hall, 2006).

O potencial de ação (PA) é uma variação abrupta do potencial transmembrana (V_m), a partir do valor de repouso (tipicamente -85 a -95 mV em relação ao meio externo, para miócitos cardíacos), na direção de valores positivos, que podem chegar a até 40 mV, seguida de retorno ao potencial de repouso (Guyton & Hall, 2006). A reversão de V_m (despolarização) é possível a partir da abertura de canais de sódio presentes na membrana celular, que se abrem em resposta ao aumento do potencial de membrana. Aumentos deste potencial elétrico levam V_m a valores menos negativos, e, conseqüentemente, este potencial atinge um valor crítico, ou limiar, que causa o disparo do PA (Aidley, 1989).

A membrana celular, em repouso, se comporta como uma resistência e uma capacitância em paralelo. De forma análoga a um modelo de circuito elétrico, V_m reage a um estímulo elétrico

de forma similar à carga de um capacitor, durante o estímulo, e de modo similar à descarga de um capacitor sobre uma resistência, após cessar o estímulo. Se o estímulo elétrico é alto o suficiente para produzir uma resposta que cruze um nível particular de V_m , o PA é gerado. Esse nível crítico de potencial é chamado de potencial limiar e é próprio de cada tipo de célula excitável. Para estímulos abaixo desse limiar, assumindo que a resistência e a capacitância da membrana sejam constantes, o sistema é passivo. Acima do limiar, o sistema é ativo e a resistência e a capacitância da membrana variam com V_m , durante o PA (Aidley, 1989).

A atividade elétrica é sucedida por atividade contrátil, a partir do acoplamento excitação-contracção (AEC), e se propaga por toda a célula (teoria de circuitos locais, Aidley, 1989) e entre células por meio de junções comunicantes, também conhecidas como junções *gap*, de baixa resistência localizadas nos discos intercalares. O AEC ocorre devido à entrada de Ca^{2+} por meio de canais de cálcio do sarcolema durante o PA. Ele se liga aos miofilamentos e possibilita o desenvolvimento de força e encurtamento celular, além de interagir com os sítios de ligação de canais de liberação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático e desencadear aumento da concentração plasmática do íon (Bers, 2001).

Alterações do ritmo normal de batimentos cardíacos são chamadas arritmias cardíacas. Essas são condições patológicas que podem alterar o funcionamento do coração, interferir em sua eficiência contrátil e podem inclusive levar a morte (Opie, 1998). Nos casos mais graves, em que as arritmias prejudicam o funcionamento dos ventrículos, a função bombeadora fica comprometida e pode não haver circulação de sangue. Um exemplo que pode causar morte em poucos minutos é a fibrilação ventricular (FV), em que há contracção desordenada dos miócitos ventriculares e há comprometimento severo da função cardíaca. Essa condição é causada pela perda da organização sequencial de sua ativação elétrica, e, embora haja contracção individual das células, não há um padrão organizado e não ocorre o bombeamento (Jalife, 2000; Guyton & Hall, 2006; Jones & Lodé, 2007).

A única terapia disponível atualmente para reverter a FV é a estimulação do tecido cardíaco por choques elétricos de alta intensidade (desfibrilação). A probabilidade de morte é de 50%, caso seja tratada nos 5 primeiros minutos, e aumenta 10% a cada minuto que a condição passa sem tratamento (Eisenberg *et al.*, 1980; Larsen *et al.*, 1993).

Aproximadamente 600 mil pessoas sofrem paradas cardíacas dentro e fora dos hospitais todos os anos nos Estados Unidos. Em 2010, 23% tiveram fibrilação ventricular ou taquiarritmia

confirmada e receberam choques elétricos de alta intensidade. A taxa de sobrevivência entre as pessoas que tiveram FV confirmada foi de apenas 32% (Roger *et al.*, 2012). Não há dados consistentes a respeito da ocorrência de FV no Brasil, mas não há razões para acreditar que sejam significativamente diferentes.

Apesar de essencial para reestabelecimento do ritmo cardíaco normal, a desfibrilação pode causar danos irreversíveis ao tecido cardíaco, como depressão contrátil, diminuição da excitabilidade celular, distúrbios na condução do PA e até morte celular (Avitall *et al.*, 1990; Tung, 1996, Fedorov *et al.*, 2008), porque parte das células pode receber intensidade de campo maior que 100 V/cm (Yabe *et al.*, 1990), de alto potencial lesivo (Oliveira *et al.*, 2008). Entretanto, outras podem receber campos menores do que o necessário para excitação, tipicamente 3 a 7 V/cm (Ideker *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2008), devido a formação de gradientes de potencial não uniformes no músculo cardíaco (Tang *et al.*, 1992; Al-Khadra *et al.*, 2000).

Essas lesões celulares são normalmente causadas pelo fenômeno da eletroporação, ou eletropermeabilização, que consiste em formação de poros hidrofílicos a partir de poros hidrofóbicos na membrana celular (Figura 1.1) (Weaver, 1994). Estes poros hidrofóbicos não permitem passagem de íons e acontecem espontaneamente na membrana, causados pela agitação térmica dos fosfolípides que a constituem. Assume-se que o poro hidrofóbico se transforme em poro hidrofílico quando excede um raio crítico, acompanhado de rearranjo das cabeças polares dos fosfolípides. Isso permite passagem de moléculas polares e íons que no repouso seriam praticamente impermeantes ou teriam permeabilidade controlada. Há expansão do poro enquanto há passagem de moléculas de água e íons a favor de seu gradiente eletroquímico (Freeman *et al.*, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996).

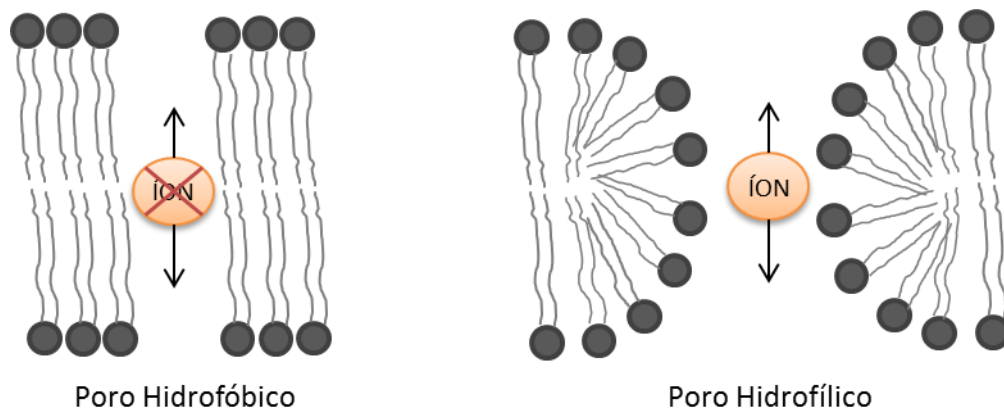


Figura 1.1 – Ilustração esquemática dos poros na bicamada lipídica que compõe a membrana celular: poros hidrofóbicos não permitem a passagem de íons e moléculas polares e poros hidrofílicos permitem (Modificado de Oliveira, 2004).

A aplicação de campos elétricos (E) de alta intensidade induz uma variação de V_m , que favorece a transformação de hidrofóbicos em hidrofílicos (DeBruin & Krassowska, 1999; Weaver & Chizmadzhev, 1996).

Quando reversível (poros hidrofílicos se fecham espontaneamente (Tsong, 1991)), a eletroporação é um mecanismo de proteção, pois causa redução da resistência da membrana e limita o aumento de V_m , induzido por E , quando mantida constante a resistência do meio externo (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Neunlist & Tung, 1997; Nikolski *et al.*, 2004). Al-Khadra *et al.* (2000) apresentam evidências experimentais de que isso pode reduzir temporariamente a vulnerabilidade do miocárdio a arritmias. Entretanto, quando a intensidade de E é alta o bastante e V_m atinge um nível crítico durante tempo suficiente, maior se torna a probabilidade de formação de poros irreversíveis e ocorrem lesões sérias, inclusive letais (Wilhelm *et al.*, 1993; Weaver & Chizmadzhev, 1996; Oliveira *et al.*, 2008). Acredita-se que a morte celular se deva principalmente ao influxo de Ca^{2+} através dos poros hidrofílicos, pois foi observado que, na ausência do íon, não há hipercontratura irreversível como consequência da aplicação dos campos de alta intensidade (Knisley & Grant, 1995, Oliveira, 2008). A faixa de V_m descrita como limiar para formação de poros é de 100 mV a 1 V, dependendo de propriedades da membrana do tipo de célula e de condições experimentais (Zimmermann *et al.*, 1974; Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999; Ivorra & Rubinsky, 2010). Para o caso de células cardíacas, a formação dos poros não seletivos é observada a partir de valores de V_m de ± 200 mV (Tung, 1996).

Os parâmetros de intensidade e duração dos pulsos elétricos aplicados estão ligados não apenas à probabilidade de ocorrência de eletroporação (Miklavčič *et al.*, 2010), mas também à resposta contrátil da célula ao estímulo elétrico. No início do século, foi apresentada a equação de Weiss-Lapicque para a excitação de células excitáveis causada pela aplicação de estímulos elétricos. Ela descreve a curva de intensidade x duração (Ix_D) para excitação celular (Lapicque, 1909) e determina os termos reobase (E_{rh}) e cronaxia (C_r), definidos como a menor intensidade de estímulo capaz de gerar excitação e a duração de pulso correspondente ao dobro desta intensidade, respectivamente. Esses parâmetros, determinados a partir da curva Ix_D, são específicos para cada tipo de célula excitável. Essa relação entre intensidade e duração do pulso aplicado mostra que quanto menor a duração, maior deve ser a intensidade de E aplicado para que haja resposta celular (Figura 1.3). A mesma regra é observada quando se trata de probabilidade de eletroporação (Miklavčič *et al.*, 2010) e de limiar de desfibrilação (Koning *et al.*, 1975; Irnich, 1990).

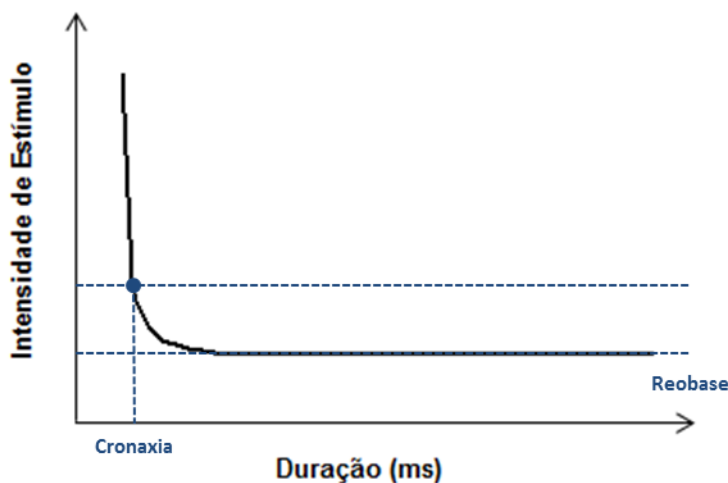


Figura 1.2 – Curva intensidade-duração que descreve a resposta de células excitáveis a estímulos elétricos.

Apesar de essa relação indicar que para durações muito próximas de zero a intensidade necessária para causar resposta contrátil seria infinita, o trabalho de Wang *et al.* (2009) mostra que mesmo pulsos com duração de 4 a 10 ns são capazes de gerar transientes de Ca^{2+} e disparar potenciais de ação, com aplicação de campo com amplitude de 10 a 80 kV/cm. Eles concluem que a resposta observada se dá não por abertura de canais da membrana, mas sim por eletroporação. A partir desses resultados, observa-se ser possível excitar e causar lesões nas células cardíacas.

cas com curtas durações de pulso, desde que a amplitude desses pulsos aplicados seja suficientemente alta.

Oliveira *et al.* (2008) estabeleceram um parâmetro que está relacionado à segurança estimulatória e à duração do pulso de alta intensidade aplicado. Eles chamaram essa relação de Fator de Segurança (FS), que é definida como a razão entre E necessário para causar lesões letais a 50% das células (EL50) e o limiar para excitação celular (E_T). Naturalmente, quanto maior o FS, menor seria a probabilidade de morte celular, ou seja, maior é a probabilidade de excitar a célula sem matá-la. Goulart & Oliveira (2012) mostraram experimentalmente que a curva do FS não varia linearmente com a duração do pulso; haveria a indicação de que esta curva teria valores crescentes para valores de duração menores que 5 ms (menor valor utilizado por eles).

Ainda faltam trabalhos para avaliar a relação entre os valores de E que causam lesões letais e os valores que causam resposta celular para durações de pulso mais curtas, abaixo de 5 ms. A duração do pulso tipicamente utilizada para desfibrilação em clínica médica é de 10 ms (Tacker & Geddes, 1996), e é necessário avaliar se pulsos com menor duração, e, conseqüentemente, maior amplitude, poderiam excitar com menor probabilidade de causar lesões aos miócitos. O presente trabalho propõe obter a curva do FS para uma larga faixa de valores de duração de pulso, de 0,1 a 70 ms. Para tanto, foi desenvolvida instrumentação específica, incluindo um estimulador de alta intensidade (50 a 1500 V), necessário para causar morte celular em miócitos cardíacos isolados com durações de estímulo de 0,1 ms a 1 ms.

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver estimulador elétrico para gerar alta tensão e aplicar pulsos com duração de 0,1 a 1 ms à câmara de perfusão.
2. Determinar a curva do Fator de Segurança para a faixa de valores de duração de pulso de 0,1 a 70 ms.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

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

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP (números 2587-1(F) e 2942-1(D)).

3.2 SOLUÇÕES

As soluções foram preparadas com água ultrafiltrada do tipo I e sais de padrão analítico. As concentrações abaixo estão apresentadas em mM.

1. Solução de Krebs-Henseleit (KREBS): 115 NaCl, 4,6 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 2,4 MgSO₄; 25 NaHCO₃; 11,1 glicose.
2. Solução de Tyrode para isolamento de células (TyrCl): 140 NaCl, 6 KCl, 1,5 MgCl₂, 5 ácido hidroxietilpiperazina-N^{''}-2 etasulfônico (HEPES), 11 glicose (pH 7,4 ajustado com NaOH).
3. Solução de Tyrode (NT): 140 NaCl, 6 KCl, 1,5 MgCl₂, 6H₂O; 1 CaCl₂.2H₂O; 5 ácido hidroxietilpiperazina-N^{''}-2 etasulfônico (HEPES), 11 glicose (pH 7,4 ajustado com NaOH).
4. Solução cardioplégica: 30 KCl; 10 KH₂PO₄; 1 MgCl₂.6H₂O; 10 HEPES; 11 glicose; 20 taurina, 70 ácido glutâmico.

3.3 ISOLAMENTO DE MIÓCITOS VENTRICULARES

As células foram isoladas por digestão enzimática do coração, conforme descrito anteriormente por Penna & Bassani (2010). Os ratos foram sacrificados por exsanguinação após concussão cerebral ou após anestesia com isoflurano. O coração foi dissecado e os miócitos do ventrículo esquerdo foram isolados por digestão enzimática a 37°. Resumidamente, a aorta foi canulada e o coração perfundido com KREBS contendo 0,5 mM de CaCl₂, em um sistema de Langendorff, por cerca de 4 minutos. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo colagenase tipo I (0,4 - 0,5 mg/ml Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 15-20 minutos. Para interromper a digestão, o coração foi perfundido com TyrCl sem colagenase, contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml; Calbiochem, San Diego, CA, EUA) por 5-8 min. O ventrículo esquerdo foi dissecado e delicadamente triturado para dissociação das células, em banho com solução cardioplégica contendo a mesma concentração de albumina.

3.4 DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

3.4.1 *Set-up* experimental

A Figura 3.1 ilustra a montagem experimental. Todos os instrumentos e dispositivos serão descritos a seguir.

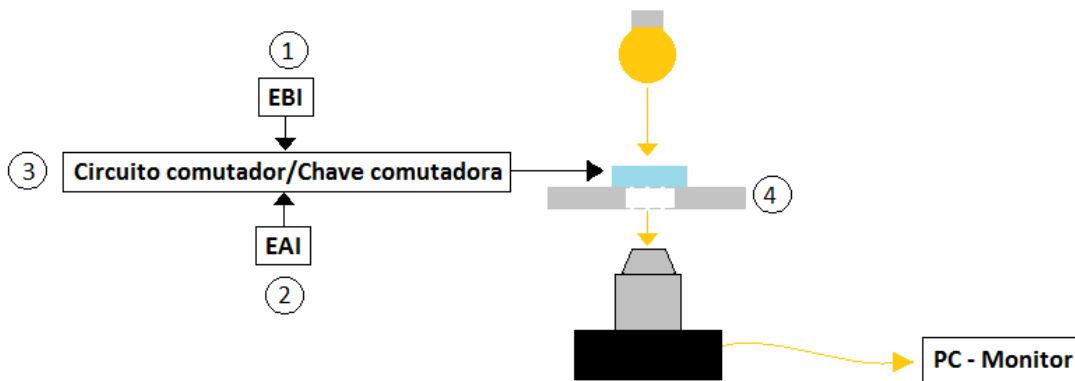


Figura 3.1 – *Set-up* experimental: 1) Estimulador de Baixa Intensidade (EBI); 2) Estimulador de Alta Intensidade (EAI); 3) Circuito comutador ou chave comutadora; 4) Sistema de microscopia.

3.4.2 Câmara de perfusão

A estimulação elétrica foi feita por dois eletrodos de platina, fixados paralelamente ao fluxo da solução e apoiados sobre o fundo da câmara. O cálculo do campo elétrico (E) estabelecido no interior da câmara (equação 3.1) é similar ao de um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008), em que V é a tensão aplicada aos eletrodos e d é distância entre eles (0,75 cm):

$$E = \frac{V}{d} \quad [3.1]$$

3.4.3 Sistema de microscopia

O sistema de microscopia desenvolvido foi construído a partir de um microscópio Zeiss. Por meio desse sistema é possível visualizar as células, captar e armazenar vídeos dos experimentos realizados. A luz (lâmpada incandescente com difusor, 30W, 6V) atravessa a câmara de perfusão com as células isoladas e atinge a objetiva, que amplia a imagem e a projeta no sensor CCD de uma câmera de vídeo (Mini WebCam 300, Leadership), conectada via USB a um computador, onde as células foram visualizadas e os arquivos de vídeo eram armazenados. Foram utilizadas

neste trabalho duas objetivas (10x – Zeiss 4946987 ou 40x – Nikon 40SC). O esquema completo está representado na Figura 3.2.

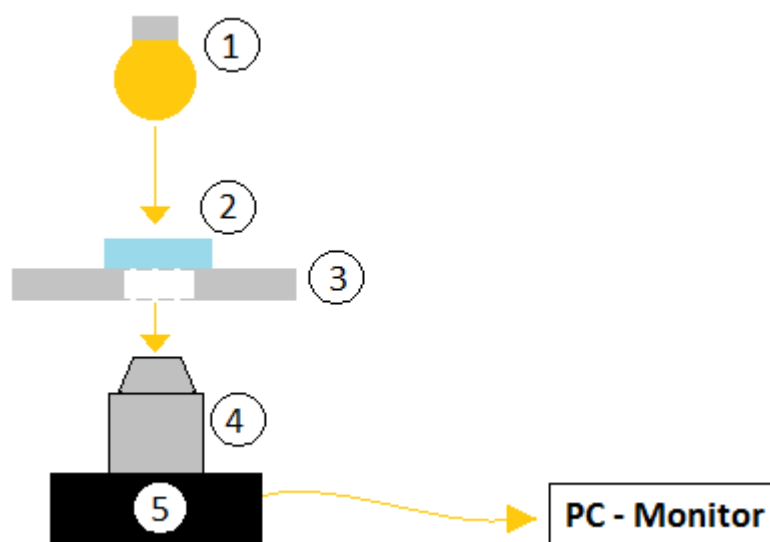


Figura 3.2 - Sistema de microscopia: 1) Iluminação incandescente com difusor; 2) Câmara de perfusão com células; 3) Charriot com ajuste de foco; 4) Objetiva; 5) WebCam com conexão USB.

3.4.4 Estimulador elétrico de baixa intensidade

Neste trabalho foi utilizado um estimulador para aplicar estímulos elétricos aos miócitos isolados com pulsos bipolares de baixa intensidade (EBI, fabricação CEB/UNICAMP, número 12.17). Características do equipamento: pulsos retangulares de tensão elétrica bipolares simétricos, com amplitude de 0 a 30 V, frequência de 0,1 a 2 Hz e duração de 0,1 a 10 ms.

3.4.5 Estimuladores elétricos de alta intensidade

Foram utilizados dois estimuladores de alta intensidade para estimular as células com pulsos monopolares de alta intensidade. Para pulsos com duração maior que 1 ms, foi utilizado um estimulador de alta potência (EAI, fabricação CEB/UNICAMP, número 02.795), que é capaz de gerar pulsos de tensão elétrica mono ou bipolares, com amplitude de 0 a 250 V, frequência de 0,1 a 10 Hz e duração de 0,1 a 10 ms.

Para pulsos com duração igual a ou menor que 1 ms, foi desenvolvido neste trabalho de mestrado um estimulador de alta intensidade (EAI), cujo diagrama em blocos está apresentado na Figura 3.3. Este estimulador gera pulso monopolar de 50 V a 1,5 kV, com duração definida pelo estimulador de baixa intensidade (EBI).

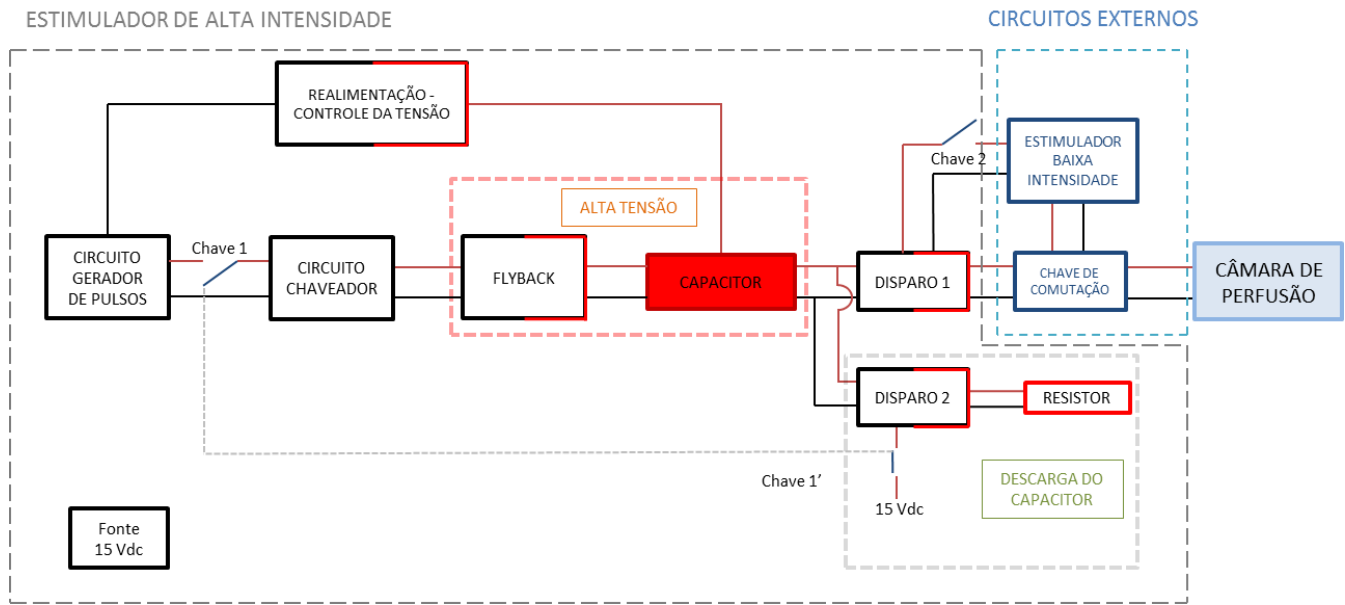


Figura 3.3 – Diagrama em blocos do sistema do Estimulador de Alta Intensidade.

3.4.5.1 Circuito chaveador, *flyback* e capacitor de alta tensão

Uma das saídas geradoras de PWM de um microcontrolador PIC16F887 é conectada ao comparador LM311 (Figura 3.4), que eleva amplitude dos pulsos de 5 V, tensão máxima de saída do microcontrolador, para 15 V. Os pulsos de amplitude de 15 V e frequência 15,8 kHz (frequência de operação do *flyback*) são aplicados à base de um transistor bipolar de junção (TBJ) 2N2219, que funciona no modo corte/saturação e, por sua vez, chaveia tensão no *gate* do *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor* (MOSFET) IRF630, que opera nas regiões de corte e triodo. Toda vez que o MOSFET conduz, corrente circula pelo enrolamento primário de um transformador do tipo *flyback* (Figura 3.4). Este transformador tem 35 espiras no enrolamento primário e aproximadamente 4 mil espiras no enrolamento secundário (saída de alta tensão) que está ligado a um diodo de retificação, incorporado ao encapsulamento do transformador. Os outros enrolamentos do *flyback* não foram utilizados.

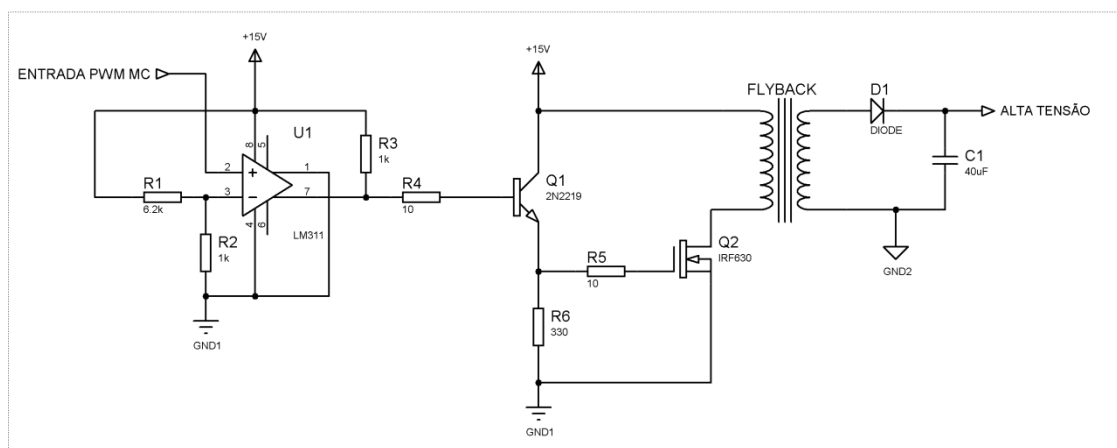


Figura 3.4 – Circuito de geração de alta tensão do Estimulador de Alta Intensidade.

A saída retificada do *flyback* é conectada a um capacitor de alta tensão (40 μF , 4 kV) que armazena a tensão elétrica a ser entregue à a câmara de perfusão com células, por meio do circuito de disparo (Figura 3.5-A).

3.4.5.2 Circuitos de disparo 1 e 2

O EBI é conectado à entrada de um opto acoplador 4N25 (Figura 3.5-A), para que o transistor interno do opto acoplador opere em corte/saturação e conduza corrente apenas durante o pulso de baixa intensidade. Este transistor pulsa a tensão de alimentação (15 V) no *gate* de um transistor IGBT (*Isolated Gate Bipolar Transistor*) IXBX25N250 (2,5 kV, 25 A), que também passa a funcionar no modo corte/saturação: quando há aplicação do pulso de baixa intensidade na entrada, o IGBT conduz e permite a descarga de tensão sobre a câmara de perfusão (resistência da câmara $\cong 250 \Omega$), como mostra a Figura 3.5-A (disparo 1). O pulso de tensão mais alta que é aplicado à câmara de perfusão tem duração igual aos pulsos de baixa intensidade aplicados pelo EBI.

De maneira análoga, o circuito de descarga do capacitor de alta tensão (disparo 2) é acionado por uma chave que aplica de 15 V ao opto acoplador. Quando essa chave é acionada, não é possível mandar pulsos do microcontrolador para o circuito chaveador, pois os pulsos são desacoplados (chave 1, Figura 3.3). Ao se acionar opto acoplador, é aplicada tensão de 15V no *gate*

do IGBT, fazendo-o conduzir, descarregando a tensão armazenada no capacitor em um resistor de 12 k Ω (Figura 3.5-B).

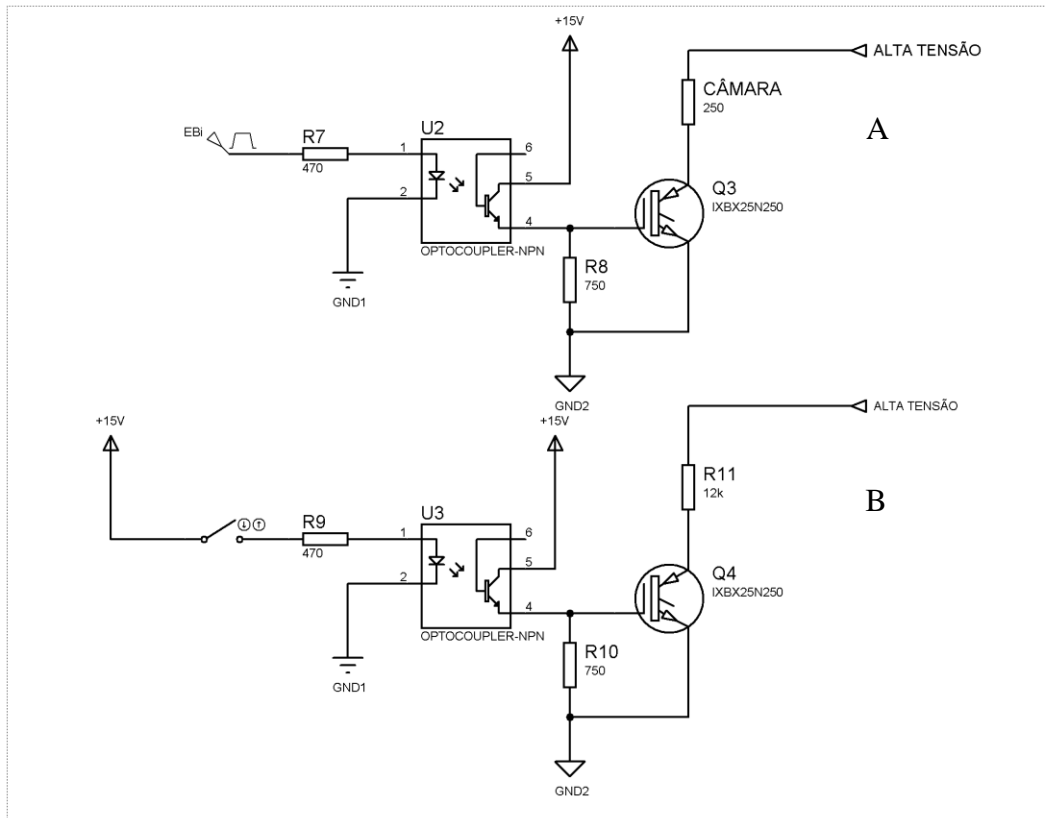


Figura 3.5 – Circuitos de disparo sobre a câmara de perfusão (A) e descarga do capacitor sobre resistor (B).

3.4.5.3 Circuitos de realimentação, controle da tensão e gerador de pulsos

O circuito de realimentação para controle da tensão armazenada no capacitor consiste de um divisor de tensão resistivo, de três amplificadores operacionais e um opto acoplador, como ilustrado na Figura 3.6. Uma amostra da tensão ($\sim 0,6\%$) é ajustada por amplificadores operacionais para uma faixa de amplitude entre 2 e 10 V. Para essa faixa de tensão de entrada, o circuito formado pelo opto acoplador 4N25 e os resistores R19 e R20 opera de forma linear e a saída, que está ligada ao conversor A/D do microcontrolador (Figura 3.7), corresponde a uma tensão entre 0,18 e 3,61 V.

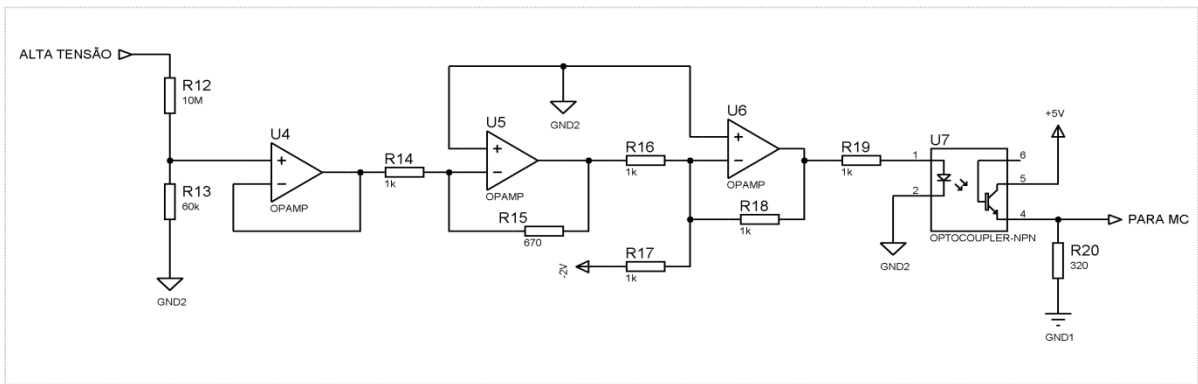


Figura 3.6 – Circuito de transformação da tensão para faixa de operação linear do transistor do opto acoplador, para realimentação.

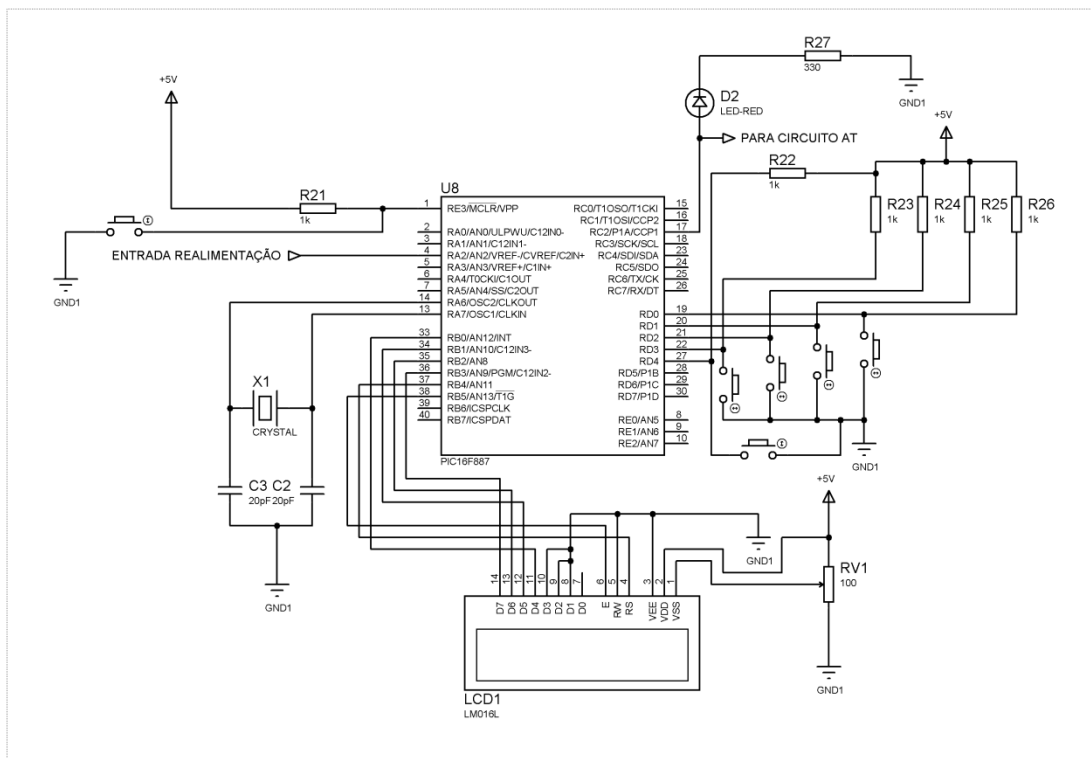


Figura 3.7 – Circuito de controle do nível de tensão, via microcontrolador, a partir do circuito de realimentação.

O microcontrolador compara o valor da tensão de entrada de realimentação com o valor de tensão escolhido pelo usuário por meio de chaves táteis. Quando a tensão do capacitor atinge este valor, a saída de pulsos para o circuito de geração de alta tensão é interrompida.

A programação inserida no microcontrolador segue o fluxograma mostrado na Figura 3.8.

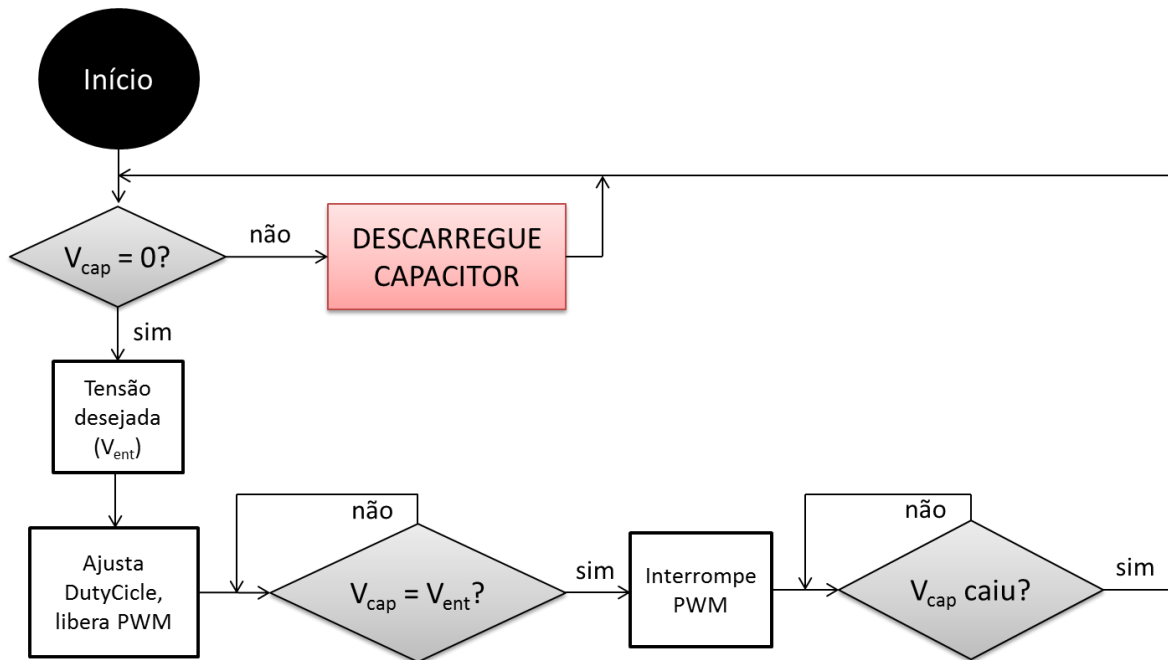


Figura 3.8 – Fluxograma em que se baseia a programação do microcontrolador, para controle da tensão armazenada no capacitor.

Resumidamente, a tensão do capacitor (V_{cap}) é medida e, caso seja diferente de zero, é mostrada a mensagem “DESCARREGUE CAPACITOR” no *display*. Essa medida evita que o capacitor permaneça carregado com altos níveis de tensão e possa expor o usuário a algum risco. Caso a tensão medida seja igual a zero, é pedido que usuário insira o valor que deseja aplicar à câmara (V_{ent}). Caso essa entrada seja menor que 250 V, o *duty cycle* dos pulsos PWM é igual a 20%, de 250 a 500 V é igual a 50 % e acima disso, 70%. Isso evita o carregamento rápido para valores baixos e permite que o sistema seja mais preciso, assim como torna mais rápido o carregamento para valores altos. Os pulsos para o circuito de alta tensão são então liberados, até que a tensão lida pela porta analógica do microcontrolador seja correspondente ao valor inserido. Quando isso acontece, os pulsos são interrompidos e o programa aguarda a queda de tensão decorrente da aplicação do pulso à câmara de perfusão, para retornar ao início e aguardar um novo ciclo.

3.4.6 Circuito comutador/sincronizador

Para experimentos com pulsos de duração superior a 1 ms, foi utilizado um circuito de comutação/sincronismo (fabricação CEB/UNICAMP número 01.7843 - adaptado) para sincronizar o disparo dos pulsos dos estimuladores de baixa e alta intensidade e alternar entre pulsos de baixa e alta intensidade por meio de uma chave de seleção.

3.4.7 Chave comutadora

Uma chave de seleção foi construída (Figura 3.9) para acoplar a câmara de perfusão aos estimuladores de modo seguro, uma vez que estávamos trabalhando com níveis altos de tensão. Esta chave, desenvolvida neste trabalho, possui 3 posições que são alternadas por meio de um servo motor (Tower Pro, MG90S) e seu controle eletrônico. Basicamente, os terminais centrais da chave estão acoplados ao eixo do motor, e dependendo da posição do eixo, os eletrodos da câmara de perfusão recebem estímulo do EAI ou do EBI, ou não recebem estímulo.

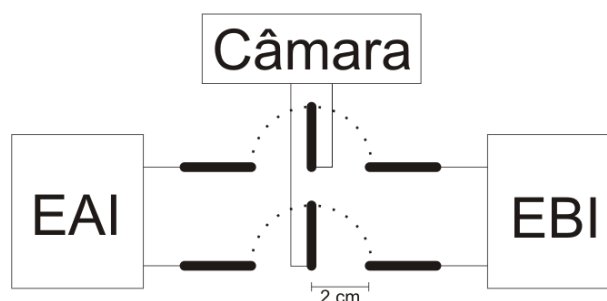


Figura 3.9 – Esquema da chave utilizada para alternar entre os estimuladores de alta e baixa intensidade.

O circuito de controle da chave está apresentado na Figura 3.10. Este circuito foi projetado com um temporizador LM555 no modo astável. Quando a chave SW1 está na posição superior, são liberados pulsos (50 Hz) de duração de 1,5 ms e o motor posiciona-se na região central e a câmara de perfusão fica desacoplada dos estimuladores. Quando está no centro, a duração é de 0,5 ms e o motor se move 90° para a esquerda (conexão com o EBI), e quando está na posição

inferior, a duração é de 2,7 ms e o motor se move 180° graus para a direita (conexão com o EAI). Considerou-se que esta fosse a configuração mais segura para lidar com os níveis de tensão mais altos.

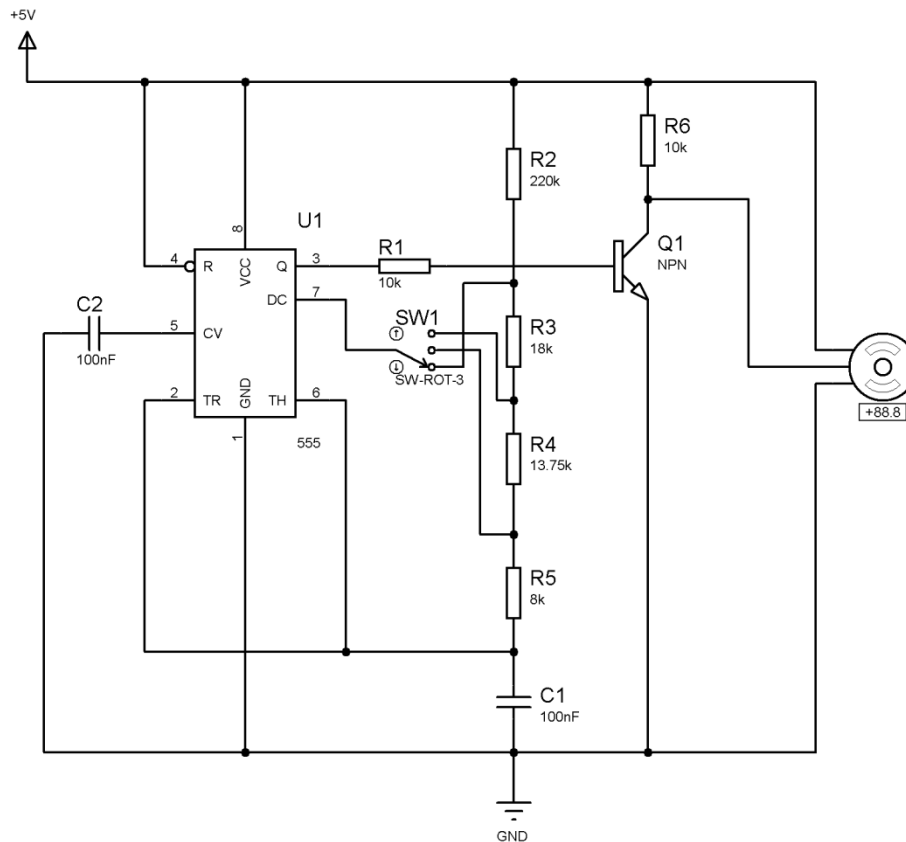


Figura 3.10 – Circuito de comando do servo motor acoplado à parte móvel da chave comutadora.

3.4.8 Osciloscópio digital

Foi utilizado um osciloscópio digital com dois canais e largura de banda de 60 MHz (OSC, fabricação Agilent Technologies, modelo DSO3062A) para medir a amplitude de tensão dos pulsos fornecidos pelos estimuladores de baixa e alta intensidade. Para tensões acima de 250 V, foram utilizadas duas pontas de prova para alta tensão (fabricação Agilent Technologies, modelos 10076B (250 MHz, 100:1, 4 kV) e N2771B (1000:1, 30kV, 50 MHz)).

3.5 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

3.5.1 Dimensões celulares

Por meio de uma grátícula micrométrica com precisão de 10 μm (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) calibramos o sistema e obtivemos uma escala fixa para estimar o comprimento (2c) e a largura (2a) das células em repouso.

3.5.2 Campo elétrico limiar (E_T)

Para realização dos experimentos, foram escolhidas células cujo maior eixo estivesse disposto paralelamente às linhas de campo. Iniciava-se, então, a estimulação de baixa intensidade e o valor da tensão aplicada era diminuído gradualmente, até que não fosse possível observar atividade contrátil. Considerou-se como amplitude limiar o menor valor de tensão aplicado a que as células respondiam com contração. O campo elétrico limiar foi calculado por meio da Equação 3.1.

3.5.3 Máxima variação do potencial de membrana induzida por E_T de 5 ms

Para o cálculo da máxima variação potencial de membrana induzida por E_T com duração de 5 ms (ΔV_T), foi utilizado o modelo proposto por Klee & Plonsey (1976). Neste modelo, é assumida a forma geométrica de um esferoide prolato para o miócito cardíaco e utiliza-se as dimensões celulares e o valor de E_T aplicado para calcular ΔV_T (Bassani *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008):

$$\Delta V_T(E_T, \theta, a, c) = E_T(a^2 A^2 \sin^2 \theta + c^2 C^2 \cos^2 \theta)^{1/2} \quad [3.2]$$

em que a é metade da dimensão do eixo menor da célula (2a), c é metade da dimensão do maior eixo da célula (2c), θ é o ângulo entre as linhas do campo E e o maior eixo da célula, A e C são constantes dependentes das dimensões celulares:

$$A = \left\{ 1 - 0,5 \epsilon^{-2} - \left[0,25(1 - \epsilon^2) \ln \frac{(1-\epsilon)}{(1+\epsilon)} \right] \epsilon^{-3} \right\}^{-1} \quad [3.3]$$

$$C = \left\{ \epsilon^{-2} - \left[0,5(1 - \epsilon^2) \ln \frac{(1-\epsilon)}{(1+\epsilon)} \right] \epsilon^{-3} \right\}^{-1} \quad [3.4]$$

$$\epsilon = \left(1 - \frac{a^2}{c^2} \right)^{1/2} \quad [3.5]$$

Neste trabalho, as células usadas tinham o maior eixo paralelo às linhas de campo, portanto $\theta = 0$, $\cos \theta = 1$ e $\sin \theta = 0$. A equação de ΔV_T , para essas condições, se torna:

$$\Delta V_T(E, \theta, a, c) = E \times c \times C \quad [3.6]$$

3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram realizados experimentos com diferentes durações de pulso, que variaram de 0,1 a 70 ms, definindo 10 grupos experimentais (0,1; 0,2; 0,5; 1; 3; 5; 10; 20; 35 e 70 ms). O procedimento experimental era feito de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 3.11.

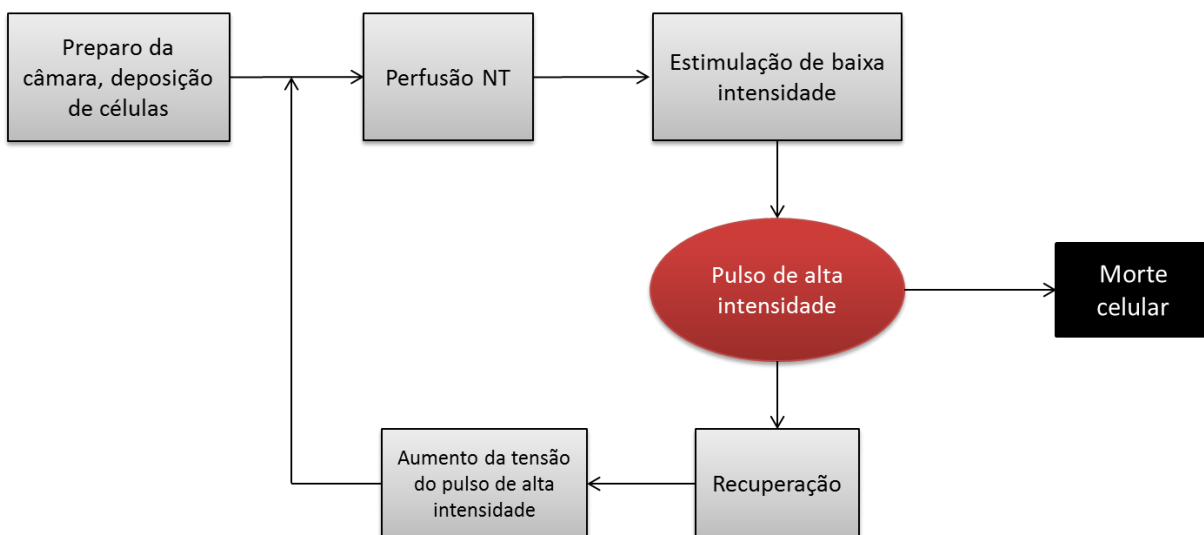


Figura 3.11 – Fluxograma do protocolo experimental.

Inicialmente, a suspensão de miócitos ventriculares isolados era depositada sobre a lamínula de vidro da câmara de perfusão. A deposição dos miócitos isolados foi feita sobre uma fina camada de colágeno aplicada ao fundo da câmara, o que facilitava a adesão das células. Antes de cada experimento, eram aguardados aproximadamente 20 minutos para secagem do colágeno e 30 a 40 minutos para sedimentação das células. Após esse tempo, as células eram perfundidas com solução de Tyrode à taxa de 3 a 4 mL/min.

Uma célula na posição longitudinal era selecionada e era determinado o limiar de excitação para 5 ms (pulso bipolar) e para a duração específica do grupo (E_T). Estimulava-se eletricamente a célula com pulsos de baixa intensidade com duração do grupo experimental e com amplitude de tensão aproximadamente 1,2 vezes o limiar encontrado. Quando a amplitude de contração se estabilizava, aplicava-se um único choque monopolar de alta intensidade à câmara, por meio do circuito de comutação ou da chave de comutação. O pulso de alta intensidade era ajustado de acordo com um fator multiplicador do limiar de excitação. Após aplicação do choque de alta intensidade, observava-se o comportamento da célula, que poderia apresentar morte celular ou se recuperar. Era aguardado um tempo para recuperação, até que a célula voltasse a responder normalmente aos estímulos e não apresentasse contrações espontâneas.

Caso a morte celular não ocorresse, a amplitude do estímulo de alta intensidade era aumentada e o procedimento era repetido até que a morte celular fosse constatada. A morte celular

foi definida como desenvolvimento de hipercontratura irreversível, inexcitabilidade e perda da integridade física da membrana e da organização intracelular (Oliveira *et al.*, 2008).

Ao fim do experimento, as células restantes eram desprezadas e a câmara de perfusão e os eletrodos eram limpos com álcool 70% e água deionizada.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os grupos de células foram comparados quanto a E_T referente a 5 ms, ΔV_T , 2c e 2a. Foram aplicados 3 testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk). Considerou-se a distribuição como normal quando pelo menos 2 destes 3 testes obtiveram este resultado. Para comparação de múltiplos grupos, foi utilizada a análise de variância monofatorial ou análise de Kruskal-Wallis, caso a distribuição não fosse considerada normal.

3.7.1 Curvas de letalidade

Para cada grupo experimental, utilizou-se o máximo valor subletal e o valor letal de E de cada célula para determinarem-se as funções que relacionam probabilidade de letalidade ao valor de amplitude de E (*survival analysis*, Kleinbaum, 1996). A análise de sobrevivência gera tabelas de probabilidade de letalidade em função de E, que são compostas pelos valores médios e seus respectivos valores de erro-padrão da média (EPM). As curvas obtidas foram comparadas pelo teste de Mantel-Cox (Mantel, 1966) e $p < 0,05$ foi indicador de significância estatística.

Foi feito ajuste não linear dos valores da tabela a uma função sigmoide ($f(x)$, Equação 3.7). Este ajuste obteve os valores de EL50 (valor de E associado à probabilidade de 0,5), e também de n , que é o coeficiente de Hill, para cada curva. É importante salientar que os valores mínimo e máximo de $f(x)$ foram considerados constantes e iguais a 0 e 1, respectivamente. Em todos os casos, o ajuste foi considerado adequado aos pontos ($R^2 > 0,9$).

$$f(x) = \frac{1}{1 + \left(\frac{L50}{x}\right)^n} \quad [3.7]$$

Os resultados estão apresentados como média acompanhada de EPM ou intervalo de confiança para 95% (IC95), para EL50.

3.7.2 Curvas intensidade-duração

A curva IxD de excitação foi ajustadas à equação de Weiss-Lapicque (Equação 3.8), em que $f(x)$ é a intensidade de campo elétrico para duração de pulso x , I_{rh} é o valor da reobase (módulo de campo quando x é infinito) e Cr , da cronaxia (duração de pulso correspondente ao dobro da reobase).

$$f(x) = I_{rh} \left(1 + \frac{Cr}{x}\right) \quad [3.8]$$

O melhor ajuste da curva IxD de letalidade foi obtido pela equação proposta por Krasowska *et al.* (2003) para eletroporação, modificada pela adição de uma constante B , como indicado abaixo (Equação 3.9). Neste caso, $f(x)$ é o valor de EL50, que corresponde ao valor de campo necessário para causar morte celular a 50% das células analisadas, enquanto x corresponde à duração de pulso.

$$f(x) = kx^A + B \quad [3.9]$$

3.7.1 Fator de segurança

Os pontos da curva de FS foram obtidos a partir da divisão dos pontos da curva IxD para letalidade pelos pontos correspondentes a mesma duração de estímulo da curva IxD para excitação. O ajuste da curva foi feito pela equação resultante da divisão simples entre a equação 3.9 e a equação 3.8.

4 RESULTADOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

4.1.1 Sistema de microscopia

O sistema de microscopia desenvolvido para este trabalho (Figura 4.1) tem um aumento de aproximadamente 1330 vezes, quando utilizada a objetiva de 40x e de aproximadamente 302,5 vezes, quando utilizada a objetiva de 10x. A relação de calibração para medição das células foi de 133 mm para 100 μm .

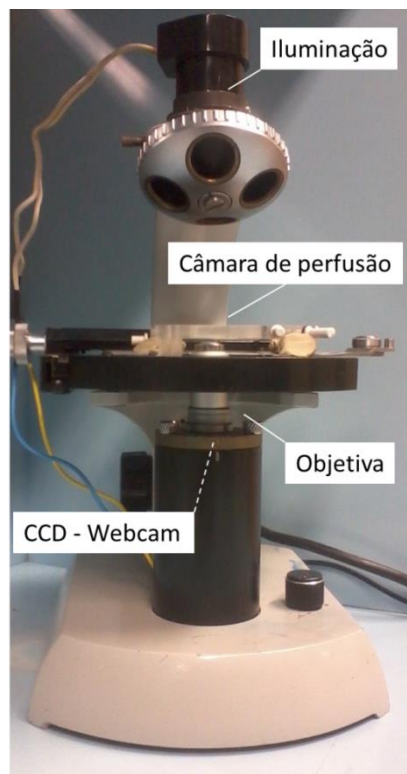


Figura 4.1 – Sistema de microscopia desenvolvido.

4.1.2 Chave comutadora

A chave comutadora desenvolvida neste trabalho para alternar entre os circuitos de baixa e alta intensidade está apresentada na Figura 4.2. A conexão com o EBI (Figura 4.2-A) é feita por um conector BNC e do EAI (Figura 4.2-B) por dois conectores banana isolados, assim como a conexão com os eletrodos da câmara de perfusão (Figura 4.2-C).

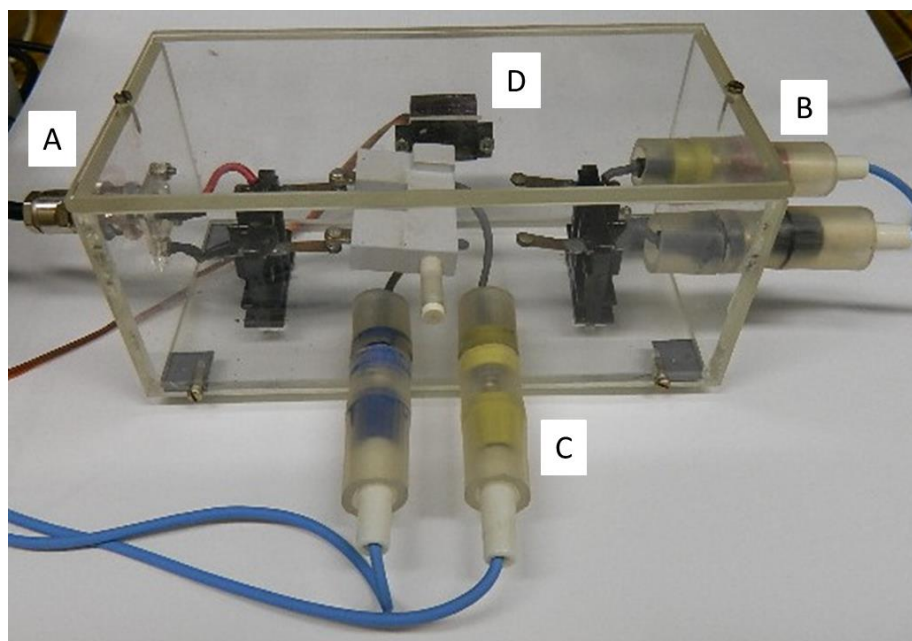


Figura 4.2 – Chave comutadora: A) Entrada do Estimulador de Baixa Intensidade; B) Entrada do Estimulador de Alta Intensidade; C) Saída de pulsos para a câmara de perfusão; D) Servo motor.

4.1.3 Estimulador de alta intensidade

4.1.3.1 Circuito gerador de alta tensão

A curva do carregamento do capacitor de alta tensão até aproximadamente 1,5 kV está apresentada na Figura 4.3. É possível observar que o circuito gerador de alta tensão (Figura 3.4) carrega o capacitor até a referida tensão em aproximadamente 80 s. A seta na figura indica o

momento em que a chave do circuito de descarga do capacitor foi acionada; o descarregamento completo ocorre em aproximadamente 4 s.

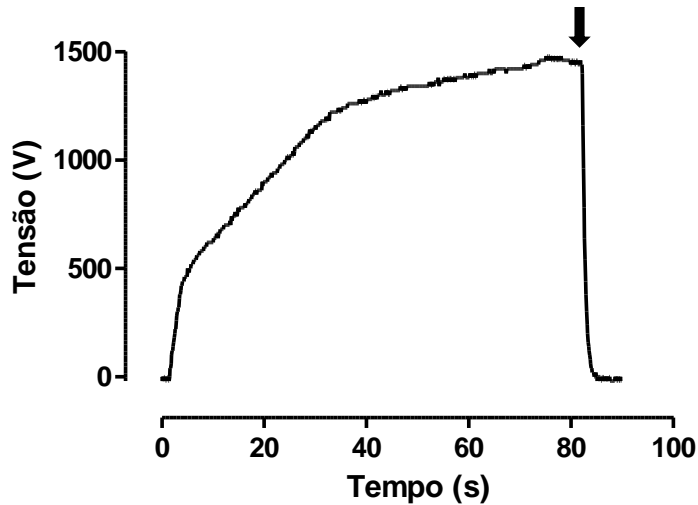


Figura 4.3 – Carregamento do capacitor de alta tensão até 1,5 kV. A seta indica o momento de acionamento do circuito de descarga.

4.1.3.2 Circuito de disparo

Os pulsos gerados para 0,1, 0,5 e 1 ms estão apresentados nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6. O capacitor foi carregado com uma tensão de teste e o circuito de disparo foi então acionado (Figura 3.5-A) e o pulso sobre a câmara de perfusão foi observado. A queda de tensão para duração de 0,1 ms é de 4% (valor inicial de 100 e final de 96 V), a queda para 0,5 ms é de 12,2% (valor inicial de 98,7 e final de 86,5 V) e para 1 ms é de 17,5% (valor inicial de 99,8 e final de 82,3 V).

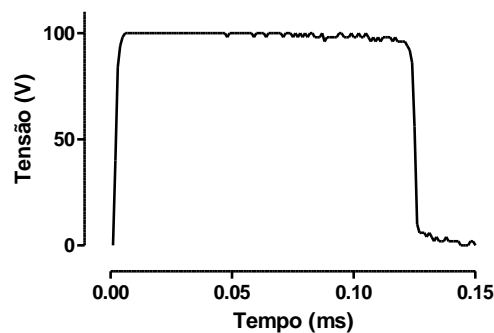


Figura 4.4 – Pulso de 0,1 ms, tensão de 100 V. A largura total do topo do pulso é de 114 μ s.

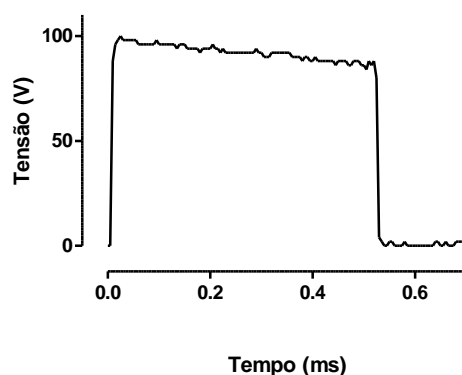


Figura 4.5 – Pulso de 0,5 ms, tensão de 98,7 V. A largura total do topo do pulso é de 520 μ s.

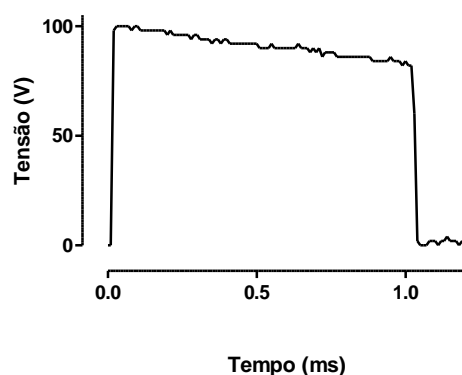


Figura 4.6 – Pulso de 1 ms, tensão de 99,8 V. A largura total do topo do pulso é de 0,99 ms.

4.1.3.3 Circuito de realimentação

A resposta obtida na saída do circuito de realimentação (Figura 3.6) que representa uma amostra da tensão armazenada no capacitor é mostrada na Figura 4.7. Esta é a tensão que retorna ao circuito do microcontrolador e permite controle do nível de tensão. A figura representa, como na Figura 4.3, o carregamento do capacitor de alta tensão até 1,5 kV. Quando os valores da saída de tensão são plotados versus os valores da saída de baixa tensão do opto acoplador, o resultado é aproximadamente linear (Figura 4.8), o que indica que o transistor do opto acoplador está operando na faixa linear, como esperado. Para que o ruído presente não alterasse o comportamento do circuito de controle, o programa inserido no microcontrolador usa como nível de tensão o valor médio de 50 leituras consecutivas, com amostragem de 1 kHz.

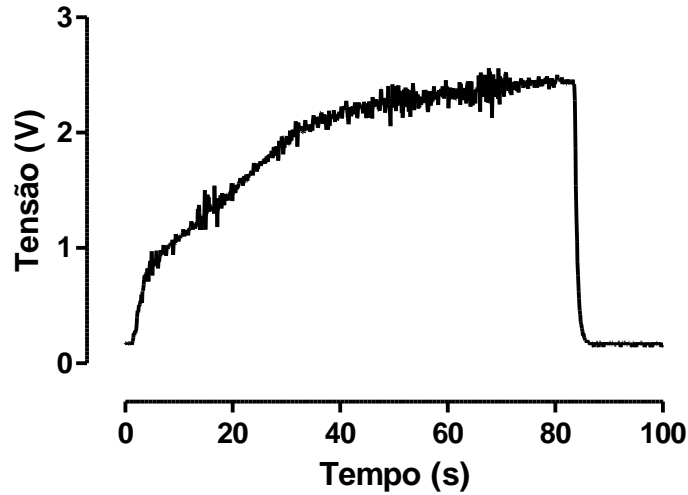


Figura 4.7 – Resposta do circuito de realimentação ao carregamento do capacitor até 1,5 kV.

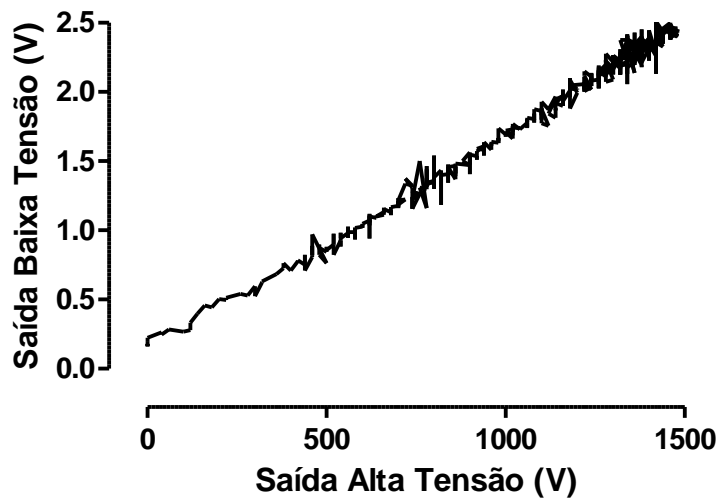


Figura 4.8 – Divisão dos valores das formas de onda obtidas nas saídas de alta e baixa tensão.

4.2 CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO

Foram definidos 10 grupos experimentais com durações diferentes: 0,1 ms ($n = 12$), 0,2 ms ($n = 7$), 0,5 ms ($n = 11$), 1 ms ($n = 10$), 3 ms ($n = 13$), 5 ms ($n = 15$), 10 ms ($n = 13$), 20 ms ($n = 11$), 35 ms ($n = 16$) e 70 ms ($n = 10$), totalizando 118 células analisadas.

A Tabela 4-1 apresenta os valores de E_T , ΔV_T (com duração de 5 ms para todos os grupos), 2a e 2c. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,1407$ para E_T ; $p = 0,1085$ para ΔV_T ; $p = 0,9727$ para 2a e $p = 0,3934$ para 2c).

Tabela 4-1 - Valores (média \pm erro padrão da média) do campo elétrico limiar para 5 ms (E_T), da máxima variação potencial transmembrana induzida por este campo (ΔV_T), dimensão do eixo menor da célula (2a) e dimensão do eixo maior da célula (2c).

Grupos	E_T (V/cm)	ΔV_T (mV)	2a (μm)	2c (μm)
0.1 ms	$2,94 \pm 0,09$	$19,92 \pm 0,92$	$28,2 \pm 1,19$	$126,2 \pm 3,97$
0.2 ms	$3,06 \pm 0,06$	$23,6 \pm 0,76$	$28,56 \pm 2,06$	$138,5 \pm 4,03$
0.5 ms	$3,11 \pm 0,08$	$19,67 \pm 0,49$	$30,14 \pm 1,29$	$117,3 \pm 4,68$
1 ms	$3,00 \pm 0,10$	$20,92 \pm 1,06$	$29,25 \pm 1,18$	$128,1 \pm 3,51$
3 ms	$3,09 \pm 0,12$	$19,63 \pm 0,58$	$28,68 \pm 1,55$	$119 \pm 4,0$
5 ms	$3,33 \pm 0,09$	$21,64 \pm 0,56$	$28,52 \pm 1,52$	$122 \pm 3,51$
10 ms	$3,262 \pm 0,12$	$21,07 \pm 0,71$	$29,09 \pm 1,75$	$120,9 \pm 4,63$
20 ms	$3,08 \pm 0,10$	$20,48 \pm 1,04$	$30,69 \pm 1,95$	$122,6 \pm 5,19$
35 ms	$3,18 \pm 0,07$	$21,15 \pm 0,6$	$28,29 \pm 0,99$	$124,8 \pm 2,65$
70 ms	$3,29 \pm 0,13$	$21,87 \pm 0,94$	$30,15 \pm 2,01$	$123,8 \pm 4,97$

A Figura 4.9 ilustra a curva IxD de excitação. O valor de reobase obtido a partir do ajuste foi de $2,57 \pm 0,13$ V/cm, o de cronaxia foi de $0,76 \pm 0,05$ ms (Equação 3.8), com $R^2 = 0,95$.

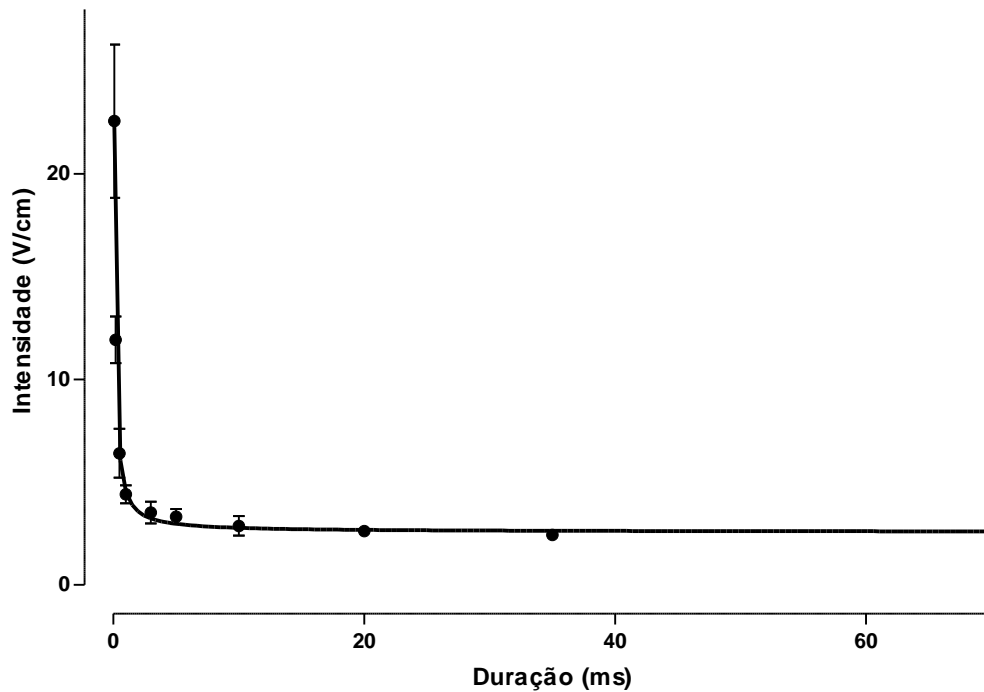


Figura 4.9 – Curva IxD para excitação. Os círculos indicam a média e as linhas verticais, o erro padrão da média.

Na Figura 4.10, estão apresentadas as curvas de letalidade celular para as 10 durações, em função da intensidade do campo elétrico aplicado. As curvas são significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

Quanto menor a duração do pulso aplicado, maior será a amplitude de campo E necessária para causar morte celular. No entanto, a partir de valores maiores que 20 ms nota-se que o valor de EL50 tende a um valor estável próximo de 53 V/cm.

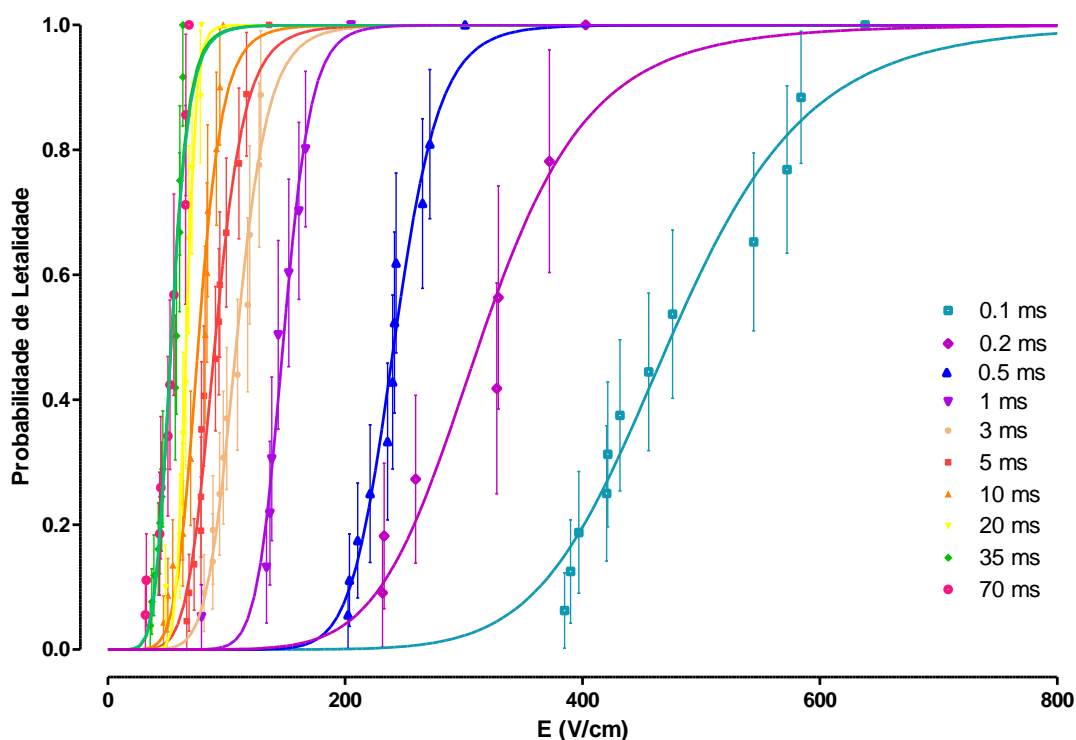


Figura 4.10 – Curvas obtidas a partir do ajuste sigmoide da tabela de probabilidade de letalidade para o campo **E**. As linhas verticais indicam o erro padrão da média.

Os valores de EL50 obtidos a partir do ajuste não linear estão dispostos na Tabela 4-2. Estes foram os valores utilizados para plotar a curva IxD para letalidade.

Tabela 4-2 – Valores (média \pm erro padrão da média) e intervalo de confiança de 95% (IC95) para EL50 (valor de **E** correspondente à probabilidade de letalidade igual a 0,5), coeficiente de Hill (**n**) e R^2 para as curvas de análise de sobrevivência para a probabilidade de letalidade.

Grupo	EL50		n	R^2
	Média \pm EPM	IC95		
0.1 ms	474,8 \pm 6,00	461,4 a 488,1	8,244 \pm 0,80	0,9627
0.2 ms	315,0 \pm 10,48	288,0 a 341,9	6,970 \pm 1,54	0,9133
0.5 ms	242 \pm 1,79	238,0 a 246,1	12,91 \pm 1,37	0,9685
1 ms	148,2 \pm 1,27	145,2 a 151,2	13,02 \pm 1,58	0,9717
3 ms	108,8 \pm 1,38	105,8 a 111,9	8,344 \pm 0,83	0,9599
5 ms	90,73 \pm 0,96	88,63 a 92,83	7,399 \pm 0,60	0,9724
10 ms	76,61 \pm 1,33	73,64 a 79,59	7,71 \pm 0,93	0,9568
20 ms	66,19 \pm 0,46	65,05 a 67,33	16,56 \pm 2,13	0,9762
35 ms	53,57 \pm 1,28	50,73 a 56,41	7,655 \pm 1,25	0,9141
70 ms	53,67 \pm 1,04	51,25 a 56,08	7,392 \pm 1,08	0,949

A curva IxD para letalidade está apresentada na Figura 4.10. O R^2 obtido pelo ajuste foi de 0,99.

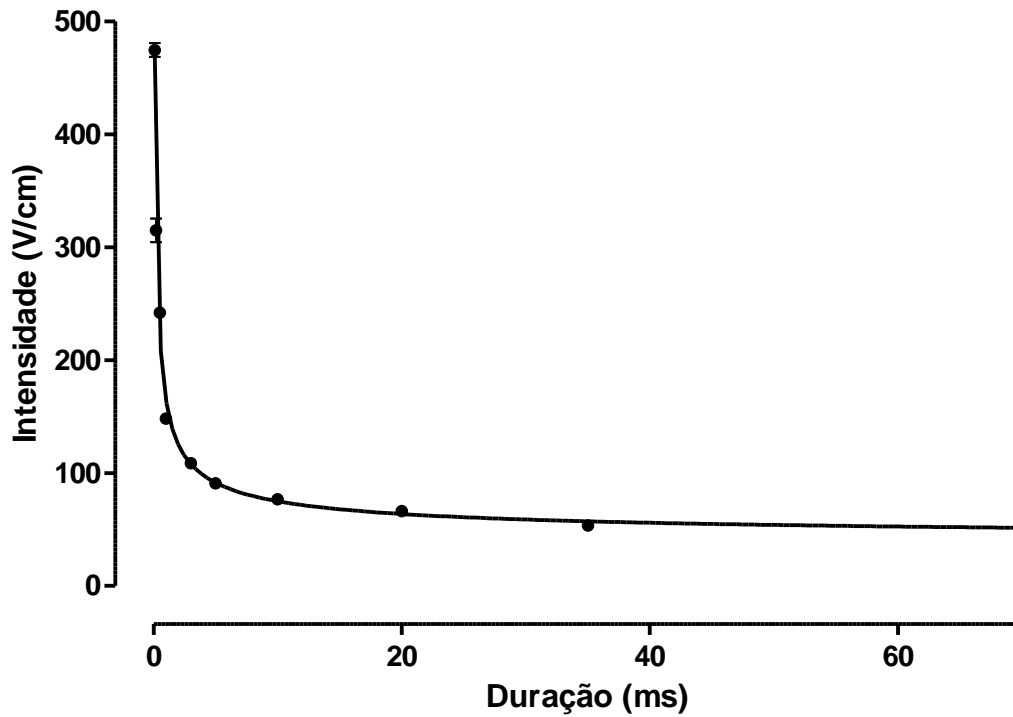


Figura 4.11 – Curva IxD para a letalidade ajustada à equação modificada de Krassowska *et al.* (2003) ; $R^2 = 0,99$. Pontos indicam o valor médio de EL50 e as barras verticais indicam o erro padrão.

Os valores de k , A e B (Equação 3.9) obtidos foram de $125,1 \pm 3,89$, $-0,53 \pm 0,01$ e $38,84 \pm 2,70$, respectivamente.

4.3 FATOR DE SEGURANÇA

A curva do FS obtida está apresentada na Figura 4.11. O R^2 obtido pelo ajuste descrito no item 3.7.1 foi de 0,90.

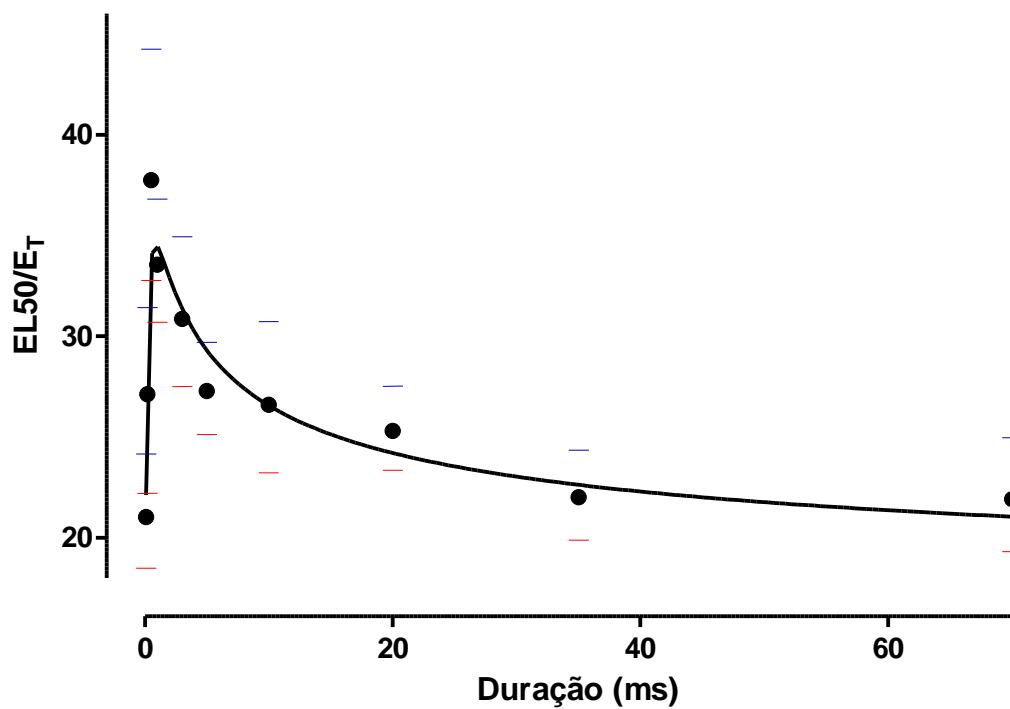


Figura 4.12 – Curva do Fator de Segurança: ajuste aos pontos obtidos por divisão entre os pontos das curvas IxD de letalidade e de excitação. Os pontos indicam o valor da divisão e os traços indicam os limites superior (em azul – limite superior EC50/ limite inferior do valor médio da excitação para a respectiva duração) e inferior (em vermelho – limite inferior EC50/ limite superior do valor médio da excitação para a respectiva duração) do intervalo de confiança de 95% (IC95).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho de mestrado foi investigado o papel da duração do pulso na letalidade de miócitos ventriculares isolados de rato submetidos a campos elétricos de alta intensidade. Para isso, foi desenvolvida instrumentação específica capaz de gerar as condições necessárias aos experimentos biológicos realizados.

5.1 INSTRUMENTAÇÃO

5.1.1 Sistema de microscopia e chave comutadora

O sistema de microscopia desenvolvido é de baixo custo e fácil manuseio. Foi possível localizar e visualizar os miócitos cardíacos, bem como gravar e armazenar os vídeos dos experimentos. O uso de uma Webcam tornou o sistema mais versátil, permitindo seu uso acoplado a qualquer computador.

A objetiva de 10x permitiu observar e localizar mais facilmente uma célula que atendesse aos critérios do protocolo experimental, enquanto o uso da objetiva de 40x restringiu o campo de visão a apenas a célula em análise.

A chave comutadora permitiu que os circuitos de baixa e alta intensidade fossem alternados de modo seguro, como era necessário para realizar os experimentos com níveis mais altos de tensão.

5.1.2 Estimulador de alta intensidade

Os circuitos descritos no item 3.4.5 funcionaram como esperado. Apesar do risco associado ao trabalho com níveis mais altos de tensão, não houve intercorrências graves ou acidentes e a operação do circuito foi segura e eficiente para aplicação dos pulsos de alta intensidade à câmara de perfusão.

O carregamento do capacitor até 1,5 kV (Figura 4.3) em 80 s foi considerado como suficientemente rápido, uma vez que para o procedimento experimental realizado não é necessário aplicar vários pulsos de uma única vez ou recarregar o capacitor em tempo mais curto. Apesar de o circuito ter sido dimensionado para atingir níveis acima de 1 kV, o pulso mais alto aplicado para causar morte celular com a menor duração de pulso (0,1 ms) foi de 638 V. O circuito foi assim projetado porque se esperava que os miócitos, para esta duração, apresentariam morte celular com intensidades de tensão aplicada muito altas (da ordem de kV), mas isso não aconteceu. A partir da projeção teórica da curva do FS para valores abaixo de 1 ms, acreditava-se que para duração igual a 0,1 ms os miócitos morreriam com aplicação de 50x o limiar específico de $22,57 \pm 1,07$ V. O fator de multiplicação real obtido foi de aproximadamente 20x, para probabilidade de letalidade igual a 0,5. Entretanto, o equipamento poderá ser aplicado em trabalhos futuros que possam exigir níveis ainda mais altos de campo elétrico do que os necessários para este trabalho.

5.2 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

5.2.1 Comparação entre grupos

O valor médio obtido para E_T (duração de 5 ms), aproximadamente 3 V/cm, foi muito próximo do valor encontrado por Oliveira *et al.* (2008) para excitação de células na longitudinal ($3,25 \pm 0,26$). O valor médio de ΔV_T , aproximadamente 20 mV, também está muito próximo do obtido por trabalhos anteriores, assim como os valores de largura (2a), aproximadamente 30 μm , e comprimento (2c), aproximadamente 124 μm (Bers, 2001; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Goulart & Oliveira, 2012).

5.2.2 Curvas de letalidade

É necessário que os parâmetros citados no item anterior sejam comparáveis estatisticamente para que as curvas de letalidade obtidas sejam comparáveis. O ângulo θ entre o maior eixo da célula e as linhas de campo elétrico também é importante, já que o limiar de estimulação e o

efeito letal de E variam conforme a orientação dos miócitos (Tung *et al.*, 1991; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Neste trabalho, as células escolhidas deveriam ter ângulo θ próximo de zero, com desvio máximo de 5° (orientação longitudinal).

Observa-se que quanto menor a duração do pulso de alta intensidade aplicado, maior é a intensidade de campo elétrico necessária para causar morte celular. Como aplicamos pulsos de alta intensidade à câmara de perfusão, foi necessário garantir que a morte celular não tenha ocorrido por aumento abrupto da temperatura causado pelo campo de alta intensidade. A variação de temperatura ($\Delta T = Q/mc$, em que Q é a energia aplicada em J, m é a massa da solução e c, o calor específico da solução) para o pior caso (301 V aplicados em 0,5 ms, energia igual a 0,18 J), admitindo que não houvesse troca de solução na câmara, foi de $0,36^\circ\text{C}$. Este valor está dentro da faixa de flutuação da temperatura ambiente, e, portanto, não foi considerado. Como a excitação celular para 0,1 ms foi feita por vezes com pulsos de amplitude superior a 20 V, para nos certificarmos de que não houvesse formação de bolhas na superfície dos eletrodos, observamos os eletrodos e a solução por 5 min com aplicação de pulsos com amplitude de 21 V, 0,1 ms, com frequência igual a 0,5 Hz, e não houve alteração observável.

Admitimos, então, que a morte celular aconteça pelo fenômeno da eletroporação, como explicado anteriormente. A eletroporação em células cardíacas, segundo Tung (1996) começa a acontecer quando o potencial de membrana V_m atinge valores por volta de ± 200 mV, mas não necessariamente leva à morte celular. Para que haja morte, é preciso que a variação do potencial transmembrana ΔV_m seja suficiente para causar danos irreversíveis (Weaver & Chizmadzev, 1996). Apesar de não estimarmos ΔV_m para a letalidade, pois o modelo de Klee & Plonsey (1976) prevê que a duração de pulso aplicado seja tal que a característica RC da membrana esteja em regime (durações ≥ 5 ms) e não considera a formação de poros na membrana, assumimos que essa variação foi suficiente para causar eletroporação irreversível durante os choques letais.

Para as curvas com duração de 10 ms (valor médio de EL50 igual a $76,61 \pm 1,33$, IC95 de 73,64 a 79,59) os resultados foram semelhantes aos obtidos anteriormente na literatura por Oliveira *et al.* (2008), com valor médio (EL50) de 67,6 e IC95 variando entre 66,30 e 68,9 V/cm e Goulart *et al.*, (2012), com valor médio (EL50) de 85,1 e IC95 variando entre 84,1 e 86,2 V/cm.

5.3 CURVAS INTENSIDADE X DURAÇÃO

5.3.1 IxD para excitação

A partir do ajuste da equação de Weiss-Lapicque para os pontos encontrados para excitação celular, obtivemos valores de reobase e cronaxia. O valor de reobase obtido foi muito próximo dos valores obtidos anteriormente por Goulart & Oliveira (2012) de $2,02 \pm 0,09$ V/cm e por Bassani *et al.* (2006) de $2,34 \pm 0,07$ V/cm, para células com orientação longitudinal. No entanto, por causa da adição à curva dos pontos de menor duração (0,1; 0,2; 0,5 e 1 ms), a cronaxia obtida foi diferente. Retirando-se estes pontos do ajuste, a cronaxia obtida passa a ser igual a $1,51 \pm 0,07$ ms, mais próximo do valor de $1,29 \pm 0,09$ ms obtida por Goulart & Oliveira (2012) e do valor de $1,77 \pm 0,14$ ms obtida por Bassani *et al.* (2006). Um motivo para que haja esse desvio no valor da cronaxia é o protocolo experimental utilizado. Nós aplicamos a cada célula apenas uma duração de pulso correspondente a um ponto na curva IxD de excitação e, normalmente, o protocolo utilizado é o de aplicar todas as durações a todas as células e em seguida fazer a média entre os valores de campo obtidos (Tung *et al.*, 1991; Bassani *et al.*, 2006).

5.3.2 IxD para letalidade

A curva IxD para letalidade foi primeiramente ajustada pela equação de Weiss-Lapicque e obtivemos $R^2 = 0,94$, mas, por ser um fenômeno diferente da excitação, procuramos outra equação que pudesse se ajustar melhor aos pontos obtidos. No trabalho de Krassowska *et al.* (2003), foi usado um trem de 6 pulsos com 10 durações diferentes e várias intensidades de campo para determinar a intensidade necessária para causar morte a 50% de células cancerosas humanas HEP-2. A curva que melhor ajustou os pontos da curva obtida naquele trabalho foi modificada, adicionando uma constante B (Equação 3.9), e usada para ajustar a curva que obtivemos ($R^2 = 0,99$) (Figura 5.1). A equação de Weiss-Lapicque foi definida a partir da resposta de células excitáveis a estímulos elétricos, enquanto a equação de Krassowska *et al.* foi usada para ajustar pontos referentes a morte celular, causada por eletroporação, como no caso deste trabalho. A constante B foi necessária porque a curva tende a um valor assintótico para durações mais longas, o

que não é observado no trabalho de Krassowska *et al.*, provavelmente porque a duração máxima dos pulsos aplicados por eles foi de 16 ms. Esse valor assintótico é adequado, já que é necessário que se estabeleça um V_m mínimo para que ocorra eletroporação, independente da duração utilizada. No caso do trabalho de Miklavčič *et al.* (2010), uma versão da mesma equação foi utilizada para descrever o ajuste de pontos correspondentes a 70% de eletroporação reversível em células de ovário de hamster chinês causada por pulsos elétricos com diferentes durações.

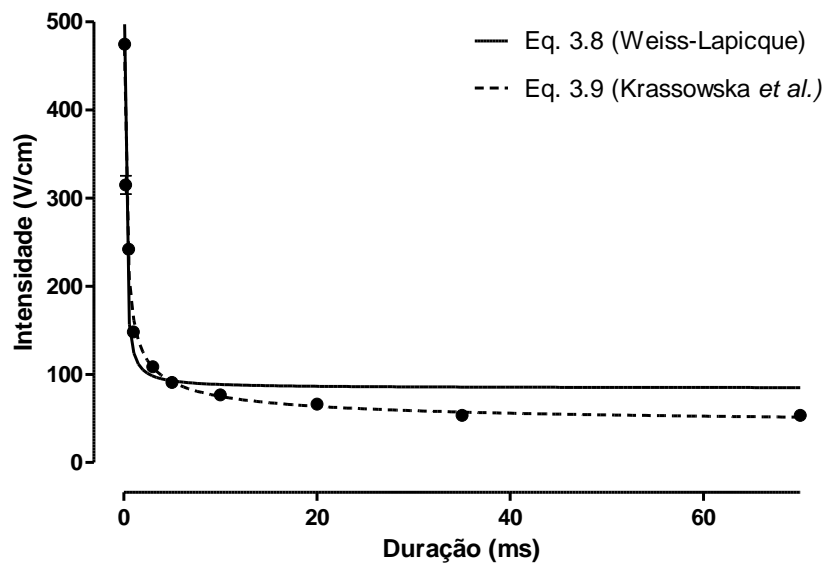


Figura 5.1 – Pontos da curva IxD para letalidade ajustados pela equação de Weiss-Lapicque (linha contínua, $R^2 = 0,94$) e pela equação modificada de Krasowska *et al.* (2003) (linha tracejada, $R^2 = 0,99$).

5.4 FATOR DE SEGURANÇA

Esperava-se que a curva de FS crescesse assintoticamente em relação ao eixo vertical (Goulart & Oliveira 2012), ou seja, quanto menores as durações utilizadas, maior seria o valor de FS. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam outra conclusão: para os menores valores de duração aplicados (0,1 e 0,2 ms), o valor de FS decaiu (Figura 4.12). O maior valor foi obtido para a duração de 0,5 ms e concluímos que esta duração compõe o ponto ótimo para a segurança estimulatória.

Uma possível explicação para a queda de FS para durações menores é que a curva de FS é resultado da divisão das curvas IxD de letalidade e excitação e a variação percentual da curva de

letalidade entre as durações de 0,5 ms e 0,1 ms foi menor que a variação correspondente às mesmas durações para a curva de excitação: as variações foram de aproximadamente 96% e 250%, respectivamente. Ainda é necessário fazer investigações mais profundas para entender o fenômeno físico responsável pela queda, mas, assumindo-se o modelo de resistência e capacitância em paralelo para a membrana celular, podemos supor que para valores mais baixos de duração, e, conseqüentemente, valores consideravelmente mais altos de tensão aplicada, as mudanças de capacitância e resistência podem influenciar a ΔV_m estabelecida (Weaver & Chizmadzhev, 1996), e aumentar a quantidade e/ou tamanho dos poros formados na membrana, acelerando o processo de contratura irreversível. É possível também que, para tais valores de tensão, a membrana de estruturas intracelulares também possa ser mais afetada (Semenov *et al.*, 2013).

Outra forma de obter a curva do FS é utilizar os valores de EC50 das curvas de sobrevivência dos valores de campo letal em termos do limiar de excitação, feita de modo análogo à análise de sobrevivência para as curvas de letalidade, descrita no item 3.7.1 (Figura 5.2). Aparentemente, as duas curvas são similares, a divisão entre as curvas variou entre 1,01 e 1,06.

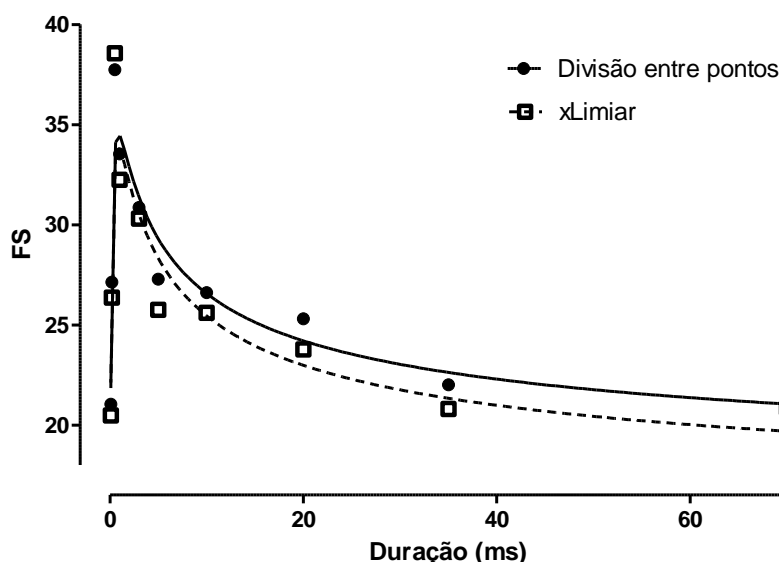


Figura 5.2 – Curvas do Fator de Segurança obtidas por divisão entre pontos das curvas IxD para letalidade e excitação (linha contínua) e por análise de sobrevivência dos valores de campo letal em vezes o limiar de excitação (linha tracejada).

Acreditamos que esse resultado possa ajudar a desenvolver protocolos mais seguros de eletropermeabilização, transfecção e estimulação de células e/ou tecidos, por exemplo, a estimulação desfibrilatória. Talvez desfibrilação com valores de duração de pulso entre 0,5 e 10 ms,

duração tipicamente utilizada na clínica (Tacker & Geddes, 1996), possa ser mais segura, se a relação entre o limiar de desfibrilação e a duração do pulso aplicado for similar a outros fenômenos de estimulação celular, como o descrito pela curva IxD para a excitação (Koning *et al.*, 1976; Irnich, 1990). Essa análise pode ser aceitável, uma vez que a desfibrilação nada mais é que um fenômeno de estimulação elétrica de uma massa crítica de células cardíacas (Zhou *et al.*, 1989). Entretanto, não é possível comparar os resultados com as curvas IxD para a desfibrilação existentes na literatura (Koning *et al.*, 1976; Gold *et al.*, 1997) para as mesmas durações, porque não incluem pontos com duração de 0,1 ms.

5.5 CONCLUSÕES

A instrumentação desenvolvida permitiu que as curvas de letalidade para uma larga faixa de durações de pulso fossem determinadas, e, por meio destas curvas, pudemos determinar pela primeira vez a curva IxD para letalidade incluindo pontos com duração abaixo de 3 ms. Pudemos, então, relacionar a curva IxD de letalidade à curva IxD de excitação e determinar a curva do FS em função da duração de pulso; encontramos um valor ótimo correspondente à duração de pulso igual a 0,5 ms. Este resultado inédito indica que a maior segurança estimulatória se encontra nesta duração.

Embora o fenômeno físico responsável pela queda dos valores de FS para durações abaixo de 0,5 ms ainda precise ser compreendido, os resultados aqui obtidos podem indicar que o decréscimo da largura do pulso aplicado, dentro de certo limite, durante a desfibrilação pode diminuir os danos causados por este processo.

Esperamos que a metodologia e os resultados aqui apresentados possam ser aproveitados em futuros estudos com aplicação de campos de alta intensidade a células isoladas, tecidos e até mesmo corações inteiros, e possam ser utilizados no desenvolvimento de equipamentos para desfibrilação mais seguros e eficientes.

REFERÊNCIAS

- Aidley, D. J. *The Physiology of Excitable Cells*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- Al-Khadra, A., V. Nikolski, and I. R. Efimov. "The Role of Electroporation in Defibrillation." *Circ Res* 87, no. 9 (2000): 797-804.
- Avitall, B., S. Port, R. Gal, J. McKinnie, P. Tchou, M. Jazayeri, P. Troup, and M. Akhtar. "Automatic Implantable Cardioverter/Defibrillator Discharges and Acute Myocardial Injury." *Circulation* 81, no. 5 (1990): 1482-7.
- Bassani, R. A., K. A. Lima, P. A. Gomes, P. X. Oliveira, and J. W. Bassani. "Combining Stimulus Direction and Waveform for Optimization of Threshold Stimulation of Isolated Ventricular Myocytes." *Physiol Meas* 27, no. 9 (2006): 851-63.
- Bers, D. M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Cheek, E. R., and V. G. Fast. "Nonlinear Changes of Transmembrane Potential During Electrical Shocks: Role of Membrane Electroporation." *Circ Res* 94, no. 2 (2004): 208-14.
- DeBruin, K. A., and W. Krassowska. "Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential." *Biophys J* 77, no. 3 (1999): 1213-24.
- Eisenberg, M. S., M. K. Copass, A. P. Hallstrom, B. Blake, L. Bergner, F. A. Short, and L. A. Cobb. "Treatment of out-of-Hospital Cardiac Arrests with Rapid Defibrillation by Emergency Medical Technicians." *N Engl J Med* 302, no. 25 (1980): 1379-83.
- Fedorov, V. V., V. P. Nikolski, and I. R. Efimov. "Effect of Electroporation on Cardiac Electrophysiology." *Methods Mol Biol* 423, (2008): 433-48.
- Freeman, S. A., M. A. Wang, and J. C. Weaver. "Theory of Electroporation of Planar Bilayer Membranes: Predictions of the Aqueous Area, Change in Capacitance, and Pore-Pore Separation." *Biophys J* 67, no. 1 (1994): 42-56.
- Gold, M. R., and S. R. Shorofsky. "Strength-Duration Relationship for Human Transvenous Defibrillation." *Circulation* 96, no. 10 (1997): 3517-20.
- Gomes, P. A., R. A. Bassani, and J. W. Bassani. "Electric Field Stimulation of Cardiac Myocytes During Postnatal Development." *IEEE Trans Biomed Eng* 48, no. 6 (2001): 630-6.
- Goulart, J. T., and P. X. Oliveira. "Relação Entre a Duração Do Estímulo E Lesão De Miócitos Cardíacos Por Campos Elétricos De Alta Intensidade." In *XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica*, 2012.

Goulart, Jair Trapé. "Vulnerabilidade De Miócitos Cardíacos a Campos Elétricos De Alta Intensidade: Influência Da Estimulação Beta-Adrenérgica." Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas, 2012.

Guyton, A., and J. E. Hall. *Textbook of Medical Physiology*. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

Ideker, R. E., P. D. Wolf, C. Alferness, W. Krassowska, and W. M. Smith. "Current Concepts for Selecting the Location, Size and Shape of Defibrillation Electrodes." *Pacing Clin Electrophysiol* 14, no. 2 Pt 1 (1991): 227-40.

Irnich, W. "The Fundamental Law of Electrostimulation and Its Application to Defibrillation." *Pacing Clin Electrophysiol* 13, no. 11 Pt 1 (1990): 1433-47.

Ivorra, A., and B. Rubinsky. "Historical Review of Irreversible Electroporation in Medicine." In *Irreversible Electroporation*, 1-21. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

Jalife, J. "Ventricular Fibrillation: Mechanisms of Initiation and Maintenance." *Annu Rev Physiol* 62, (2000): 25-50.

Jones, J. L., E. Lipeschkin, R. E. Jones, and S. Rush. "Response of Cultured Myocardial Cells to Countershock-Type Electric Field Stimulation." *Am J Physiol* 235, no. 2 (1978): H214-22.

Jones, P., and N. Lode. "Ventricular Fibrillation and Defibrillation." *Arch Dis Child* 92, no. 10 (2007): 916-21.

Klee, M., and R. Plonsey. "Stimulation of Spheroidal Cells--the Role of Cell Shape." *IEEE Trans Biomed Eng* 23, no. 4 (1976): 347-54.

Kleinbaum, D. G. *Survival Analysis: A Self-Learning Text*. New York: Springer-Verlag, 1996.

Knisley, S. B., and A. O. Grant. "Asymmetrical Electrically Induced Injury of Rabbit Ventricular Myocytes." *J Mol Cell Cardiol* 27, no. 5 (1995): 1111-22.

Koning, G., H. Schneider, A. J. Hoelen, and R. S. Reneman. "Amplitude-Duration Relation for Direct Ventricular Defibrillation with Rectangular Current Pulses." *Med Biol Eng* 13, no. 3 (1975): 388-95.

Krassowska, W., G. S. Nanda, M. B. Austin, S. B. Dev, and D. P. Rabussay. "Viability of Cancer Cells Exposed to Pulsed Electric Fields: The Role of Pulse Charge." *Ann Biomed Eng* 31, no. 1 (2003): 80-90.

Lapicque, L. "Definition Expérimental De L'excitabilité." *Soc Biol* 77, (1909): 280-283.

Larsen, M. P., M. S. Eisenberg, R. O. Cummins, and A. P. Hallstrom. "Predicting Survival from out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Graphic Model." *Ann Emerg Med* 22, no. 11 (1993): 1652-8.

Mantel, N. "Evaluation of Survival Data and Two New Rank Order Statistics Arising in Its Consideration." *Cancer Chemother Rep* 50, no. 3 (1966): 163-70.

Miklavčič, D., G. Pucihar, A. Maček-lebar, J. Krmelj, and L. Towhidi. "The Pulse Intensity Duration Dependency for Cell Membrane Electroporation." In *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, edited by A. G. Pakhomov, D. Miklavčič and M. S. Markov, 239-251. Boca Raton: CRC Press, 2010.

Neunlist, M., and L. Tung. "Dose-Dependent Reduction of Cardiac Transmembrane Potential by High-Intensity Electrical Shocks." *Am J Physiol* 273, no. 6 Pt 2 (1997): H2817-25.

Nikolski, V. P., A. T. Sambelashvili, V. I. Krinsky, and I. R. Efimov. "Effects of Electroporation on Optically Recorded Transmembrane Potential Responses to High-Intensity Electrical Shocks." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, no. 1 (2004): H412-8.

Oliveira, Pedro Xavier de. "Campo Elétrico Letal E Variação Do Poencial Transmembrana Em Miócitos Ventriculares De Rato." Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas, 2004.

_____. "Mecanismos Envolvidos Na Depressão Contrátil E Lesão De Miócitos Cardíacos Submetidos a Campos Elétricos De Alta Intensidade." Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas, 2008.

Oliveira, P. X., R. A. Bassani, and J. W. Bassani. "Lethal Effect of Electric Fields on Isolated Ventricular Myocytes." *IEEE Trans Biomed Eng* 55, no. 11 (2008): 2635-42.

Opie, L. H. *The Heart: Physiology from Cell to Circulation*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publ., 1998.

Penna, L. B., and R. A. Bassani. "Increased Spontaneous Activity and Reduced Inotropic Response to Catecholamines in Ventricular Myocytes from Footshock-Stressed Rats." *Stress* 13, no. 1 (2010): 73-82.

Roger, V. L., A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, E. J. Benjamin, J. D. Berry, W. B. Borden, D. M. Bravata, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, E. Z. Soliman, P. D. Sorlie, N. Sotoodehnia, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, and M. B. Turner. "Heart Disease and Stroke Statistics--2012 Update: A Report from the American Heart Association." *Circulation* 125, no. 1 (2012): e2-e220.

Semenov, I., S. Xiao, O. N. Pakhomova, A. G. Pakhomov. "Recruitment of the intracellular Ca^{2+} by ultrashort electric stimuli: The impact of pulse duration." *Cell Calcium* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2013.05.008>

Tacker, W. A., and L. A. Geddes. "The Laws of Electrical Stimulation of Cardiac Tissue." *Proc IEEE* 84, (1996): 355-365.

Tang, A. S., P. D. Wolf, Y. Afework, W. M. Smith, and R. E. Ideker. "Three-Dimensional Potential Gradient Fields Generated by Intracardiac Catheter and Cutaneous Patch Electrodes." *Circulation* 85, no. 5 (1992): 1857-64.

Tsong, T. Y. "Electroporation of Cell Membranes." *Biophys J* 60, no. 2 (1991): 297-306.

Tung, L. "Detrimental Effects of Electrical Fields on Cardiac Muscle." *Proc IEEE* 84, (1996): 366-378.

Tung, L., N. Sliz, and M. R. Mulligan. "Influence of Electrical Axis of Stimulation on Excitation of Cardiac Muscle Cells." *Circ Res* 69, no. 3 (1991): 722-30.

Wang, S., J. Chen, M. T. Chen, P. T. Vernier, M. A. Gundersen, and M. Valderrabano. "Cardiac Myocyte Excitation by Ultrashort High-Field Pulses." *Biophys J* 96, no. 4 (2009): 1640-8.

Weaver, J. C. "Molecular Basis for Cell Membrane Electroporation." *Ann N Y Acad Sci* 720, (1994): 141-52.

Weaver, J. C., and Y. Chizmadzhev. "Theory of Electroporation: A Review." *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41, (1996): 135-160.

Wilhelm, C., M. Winterhalter, U. Zimmermann, and R. Benz. "Kinetics of Pore Size During Irreversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayer Membranes." *Biophys J* 64, no. 1 (1993): 121-8.

Yabe, S., W. M. Smith, J. P. Daubert, P. D. Wolf, D. L. Rollins, and R. E. Ideker. "Conduction Disturbances Caused by High Current Density Electric Fields." *Circ Res* 66, no. 5 (1990): 1190-203.

Zhou, X., J. P. Daubert, and P. D. Wolf. "Size of the Critical Mass for Defibrillation." *Circulation* 80, (1989): 2115.

Zimmermann, U., G. Pilwat, and F. Riemann. "Dielectric Breakdown of Cell Membranes." *Biophys J* 14, no. 11 (1974): 881-99.