



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Fernanda dos Santos Costa Leomil

Efeito da direção do campo elétrico sobre a letalidade de miócitos cardíacos isolados

Campinas

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Fernanda dos Santos Costa Leomil

Efeito da direção do campo elétrico sobre a letalidade de miócitos cardíacos isolados

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Elétrica, na Área de Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Fernanda dos Santos Costa Leomil, e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira

Campinas

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9534-5244>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

L551e Leomil, Fernanda dos Santos Costa, 1989-
Efeito da direção do campo elétrico sobre a letalidade de miócitos cardíacos isolados / Fernanda dos Santos Costa Leomil. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Estimulação elétrica. 2. Letalidade. 3. Miócitos cardíacos. 4. Campos elétricos. I. Oliveira, Pedro Xavier de, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of electrical field direction on the lethality of isolated cardiac myocytes

Palavras-chave em inglês:

Electrical stimulation

Lethality

Cardiac myocytes

Electrical fields

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestra em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Pedro Xavier de Oliveira [Orientador]

Natália Ferreira Oshiyama

Antônio Augusto Fasolo Quevedo

Data de defesa: 24-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Candidata: Fernanda dos Santos Costa Leomil

RA: 162631

Data da Defesa: 24 de agosto de 2017

Título da Tese: Efeito da direção do campo elétrico sobre a letalidade de miócitos cardíacos isolados

Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira (Presidente)

Dra. Natália Ferreira Oshiyama

Prof. Dr. Antônio Augusto Fasolo Quevedo

A ata de defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Julgadora, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, aos meus pais, Kátia dos S. C. Leomil e Luiz Otávio da C. V. Leomil, aos meus irmãos, Renata e Luiz Felipy, e aos meus avós, José Py, Nilce, Sebastião e Vânia, por sempre acreditarem em mim e fornecerem todo o tipo de suporte que precisei;

ao Marcelo Zoccoler, pela assistência durante o projeto, paciência e incentivo em todos os momentos;

ao professor Pedro X. de Oliveira, pela orientação, ensinamentos e confiança;

ao engenheiro do Centro de Engenharia Biomédica Renato da S. Moura, pelas ideias, suporte, e pela incrível capacidade de criar tudo aquilo que precisamos;

aos professores, funcionários e técnicos do Centro de Engenharia Biomédica e do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial a Elizângela S. de Oliveira, Carlos A. L. da Silva, Flávio R. Santos e Mauro S. Martinazzo, pela dedicação e apoio nas etapas do projeto;

aos amigos e alunos do Departamento de Engenharia Biomédica, Ahmad Almazloum, Arnaldo F. Neto, Carlos A. Ferri, Eliane C. Rodrigues, Jair T. Goulart, Jeferson G. Gomes, João Carlos M. de Almeida, José Américo N. L. F. F., Lizandra A. Sá, Marcelo A. Viana, Priscila C. Antoneli e Willi D. L. Mota, pelos conhecimentos, cafés e momentos compartilhados;

ao apoio financeiro da CAPES na forma de bolsa de estudos e

a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho se concretizasse.

Resumo

As doenças cardiovasculares representam uma das principais causas de morte no mundo, uma vez que podem levar ao desenvolvimento de arritmias cardíacas graves. Dentre estas, destaca-se a fibrilação ventricular (FV), que só pode ser revertida por meio de desfibrilação. No entanto, os choques desfibrilatórios são capazes de causar danos aos cardiomiócitos. A orientação do eixo principal da célula em relação à direção de aplicação do campo elétrico (E) é um fator determinante para a excitação e lesão celular, o que tem levado ao desenvolvimento de novos protocolos de desfibrilação. O objetivo desse projeto foi obter curvas de letalidade para diferentes orientações da célula em relação à direção do E, a fim de caracterizar a relação entre a orientação celular e a letalidade. Para isto, instrumentação que permitisse a estimulação de miócitos cardíacos em diferentes orientações foi desenvolvida. Os miócitos foram isolados de corações de ratos Wistar machos adultos e as células foram dispensadas em uma câmara de perfusão com fundo giratório para estimulação, de forma que pudessem ser reorientadas em relação ao E. Inicialmente, foram aplicados pulsos de tensão bipolares para a determinação do limiar de estimulação (E_T) e, em seguida, foi aplicado um estímulo monopolar de tensão com amplitude inicial de $8xE_T$. Após a recuperação da célula, este procedimento foi repetido com amplitudes crescentes até que a lesão letal fosse observada. Nossos dados mostram que há um aumento gradual do E associado à letalidade celular, à medida que o ângulo, que pode variar entre 0° e 90° , entre a orientação da célula e a direção do E aumenta, e que uma intensidade de aproximadamente $26xE_T$ é capaz de matar 50% das células, independentemente da sua orientação. Estes resultados podem contribuir para a concepção de novos protocolos de desfibrilação, fornecendo dados sobre um limite superior do E para a sobrevivência celular.

Palavras-chaves: Choques desfibrilatórios, estimulação elétrica de cardiomiócitos, probabilidade de letalidade celular.

Abstract

Cardiovascular diseases represent a major cause of death in the world, since they can lead to the development of severe cardiac arrhythmias. Among them, ventricular fibrillation (VF) stands out, of which reversion can only be achieved by defibrillation. However, defibrillatory shocks are capable of causing injury to cardiomyocytes. The orientation of the cell major axis with respect to the electrical field (E) direction is a determining factor for cellular excitation and cellular injury, which is leading to the development of new defibrillation protocols. The aim of our study was to build lethality curves for different orientations of cell major axis with respect to E direction in order to characterize the relationship between cell orientation and lethality. For this purpose, instrumentation that allowed the stimulation of cardiac myocytes in different orientations was developed. Myocytes were isolated from hearts of adult male Wistar rats and cells were plated in a perfusion chamber with a rotary bottom for stimulation so that the cells could be reoriented with respect to the direction of stimulation if necessary. First, bipolar voltage pulses were applied to determine the stimulation threshold (E_T), and then a monopolar stimulus with initial amplitude of $8xE_T$ was applied. After cell recovery, this procedure was repeated with increasing amplitudes until cell lethal injury was observed. Our data show that there is a gradual increase in the E associated with cell lethal injury as the angle between cell orientation and E direction is increased and that an intensity of approximately $26xE_T$ is capable of killing 50% of the cells, regardless of its orientation. These results could contribute for the design of new defibrillation protocols by providing data on an E upper limit for cell survival.

Keywords: *Defibrillator-like shocks, cardiomyocyte electrical stimulation, cell probability of lethality.*

Lista de ilustrações

Figura 1. Vias de condução elétrica no coração. (Modificado de Kenny, 2014, número de licença: 4134831090447).....	17
Figura 2. Acoplamento excitação-contração e relaxamento em um cardiomiócito. No detalhe: relação temporal entre o disparo de um PA, o transiente de concentração citosólica de Ca^{2+} e a contração do miócito. (Adaptado de Bers, 2002. Número de licença: 4134911150458).	19
Figura 3. Representação dos tipos de poros que podem ser formados na bicamada lipídica: a) poro hidrofóbico e b) poro hidrofílico (Adaptado de Glaser, 1988, número de licença: 4134811446606).	22
Figura 4. Representação de cardiomiócito cujo eixo principal (maior) está orientado a 0° , 30° , 60° e 90° em relação a direção de aplicação do E.	24
Figura 5. Diagrama de blocos da montagem experimental: A) câmara de perfusão; B) computador; C) sistema de microscopia; D) suporte com reservatório contendo solução de Tyrode; E) descarte ligado ao sistema de vácuo; F) estimulador elétrico de alta intensidade (EAI); G) estimulador elétrico de baixa intensidade (EBI); H) comutador; I) osciloscópio; J) motor DC acoplado à câmara de perfusão e motores de passo acoplados ao charriot do microscópio; K) caixa contendo os circuitos para controle dos motores que permitem o giro do fundo da câmara de perfusão e a movimentação do charriot do microscópio.	27
Figura 6. Vista externa da câmara de perfusão e regiões de interesse. A) Cata-bolhas; B) região para deposição de miócitos; C) região de saída de solução.	27
Figura 7. Vista explodida da câmara de perfusão. A) Parte superior da câmara contendo cata-bolhas, região para deposição de miócitos e região de saída de solução (1), conectores para entrada e saída de solução (2 e 3) e knob (4); B) lamínula de vidro (1), o Rings (2) e peças de suporte (3); C) suporte para a lamínula (1), engrenagem acoplada ao fundo da câmara (2), engrenagem conectada ao knob (3) e suporte final da câmara (4).	29
Figura 8. Detalhe da parte óptica do sistema de microscopia: A) LED; B) câmara de perfusão; C) charriot com ajuste de foco; D) webcam; E) objetiva. (Modificado de Oliveira, 2004).	30
Figura 9. Diagrama de blocos simplificado para: A) controle do charriot, composto por dois motores de passo controlados por meio de drivers, um microcontrolador e uma interface com o usuário; B) Controle do giro do fundo da câmara de perfusão, composto pelo mesmo microcontrolador, um motor DC controlado por meio de um driver e um encoder para posicionamento do motor DC.	31
Figura 10. Circuito desenvolvido para o controle da movimentação do charriot e do giro do fundo da câmara de perfusão: A) Motores de passo bipolares; B) microcontrolador; C) motor DC; D) optoacoplador do encoder utilizado para verificação da posição do motor DC; E) drivers para controle dos motores de passo e do motor DC; F) joystick para movimentação do charriot; G) LCD; H) botões utilizados para armazenamento/recuperação de posições de miócitos; I) botões utilizados para inserção de dados relacionados ao giro do fundo da câmara.	32
Figura 11. Fluxo de execução do software responsável pelo controle do charriot, do armazenamento e recuperação de posições e da rotação do fundo da câmara de perfusão. Poty é o potenciômetro associado a movimentação do motor no eixo y (motor 1) e Potx é o potenciômetro associado a movimentação do motor no eixo x (motor 2). posicao y e posicao x são as posições atuais em passos associadas aos motores 1 e 2, respectivamente. Os botões 2, 3, 4, 5 e 6 são utilizados para armazenamento e recuperação de posições, enquanto o botão 7 é utilizado para indicar que existe uma célula a ser rotacionada.	33

Figura 12. Fluxograma referente à sub-rotina “Move motor 1”. Poty é o potenciômetro associado à movimentação do motor no eixo y (motor 1) e posicao_y é a posição atual em passos associada a este mesmo motor.	35
Figura 13. Fluxograma referente à sub-rotina “Move motor 2”. Potx é o potenciômetro associado à movimentação do motor no eixo x (motor 2) e posicao_x é a posição atual em passos associada a este mesmo motor.	36
Figura 14. Fluxograma referente ao armazenamento e recuperação de posições. Os botões 2, 3, 4, 5 e 6 são botões utilizados para configurar armazenamento e recuperação de posições de miócitos. O botão 1 é utilizado para confirmar que se deseja sobrescrever uma dada posição previamente armazenada por algum outro botão.	38
Figura 15. Fluxograma da sub-rotina “Gira Fundo da Câmara”. Os botões 7, 11 e 12 são botões associados ao giro do fundo da câmara de perfusão presentes no sistema de controle de charriot. A variável contadorenc é responsável por armazenar o número de pulsos provenientes do foto-transistor, cujo valor deve se igualar ao número de pulsos total (n) necessários para que o fundo da câmara seja rotacionado no ângulo desejado.....	40
Figura 16. Representação do giro do fundo da câmara para ilustrar o reposicionamento do charriot do microscópio	42
Figura 17. Sistema de microscopia adaptado. A) Iluminação superior; B) câmara de perfusão e motores de passo acoplados ao charriot; C) sistema de controle.....	47
Figura 18. Célula orientada a 60° visualizada no sistema de microscopia com aumento aproximado de 200 vezes.	48
Figura 19. Foto com visão aproximada do acoplamento mecânico realizado entre os motores de passo e charriot do microscópio.	49
Figura 20. Teste de precisão do deslocamento dos motores de passo: Gráfico de média e desvio padrão da média para diferentes deslocamentos em µm em função do número de passos aplicado.	49
Figura 21. A) Placa com circuito principal; B) circuitos de driver para os motores de passo; C) circuito de driver para o motor DC; D) placa de alimentação para os drivers (12V); E) placa de alimentação de alimentação para o circuito principal (5V).	50
Figura 22. Sistema de controle para movimentação do charriot e do fundo da câmara de perfusão. A) Joystick para movimentação do charriot em duas direções; B) LCD para comunicação com usuário por via de mensagens; C) botões utilizados para armazenamento e recuperação de posições de miócitos; D) botões utilizados para controle do giro do fundo da câmara de perfusão.....	51
Figura 23. Fotos das vistas A) superior e B) inferior da câmara de perfusão desmontada e suas partes principais: 1) lamínula de vidro; 2) o ring externo para vedação; 3) knob para o giro da lamínula; 4) eletrodos de estimulação; 5) conexão para entrada de solução; 6) conexão para saída de solução; 7) espaço para deposição de miócitos; 8) engrenagem menor conectada ao knob por meio de um parafuso; 9) engrenagem maior cuja parte superior está colada à lamínula de vidro.	52
Figura 24. Foto da câmara de perfusão após sua montagem. A) Região total para deposição dos miócitos e B) região útil de trabalho onde as células podem ser rotacionadas sem saírem da área de perfusão e observação.....	53
Figura 25. Câmara de perfusão acoplada ao sistema de posicionamento composto por A) motor DC; B) sistema de posicionamento; C) correia para transmissão do movimento gerado pelo motor DC ao knob da câmara de perfusão e conseqüente giro do seu fundo.	53
Figura 26. Curvas de probabilidade de letalidade de cardiomiócitos em função do campo elétrico (E) aplicado para os grupos 0° (N = 26), 30° (N = 29), 60° (N = 21) e 90° (N = 11)..	55
Figura 27. Curvas de probabilidade de letalidade em função do campo elétrico (E) aplicado para os grupos 0° (N = 26), 30° (N = 29), 60° (N = 21) e 90° (N = 11). Nestas curvas o E foi	

expresso como um múltiplo do E_T ($\times E_T$). As linhas verticais indicam o desvio padrão da média..... 57

Figura 28. Gráfico comparativo do crescimento do ET e do E letal conforme se aumenta o ângulo entre a orientação celular e a direção de aplicação do campo elétrico..... 62

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Modo de acionamento de um motor de passo em modo passo completo. A e A' representam os terminais de uma bobina e B e B' representam os terminais de outra bobina do motor. 37
- Tabela 2.** Média \pm erro padrão da média para E_T , ΔVT , $2c$ e $2a$, para os grupos experimentais 0° , 30° , 60° e 90° ($n=26$, $n=29$, $n=21$, $n=11$, respectivamente). # indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$) de um grupo em relação a todos os outros grupos. 54
- Tabela 3.** Valores médios e intervalos de confiança para 99% (IC99) dos campos elétricos com 50% de probabilidade de letalidade (E50) e do coeficiente de Hill (h) para as curvas de letalidade obtidos para os grupos experimentais 0° , 30° , 60° e 90° . * indica diferença estatística significativa com relação a todos os outros grupos. 55
- Tabela 4.** Valores médios e intervalos de confiança para 99% (IC99) dos campos elétricos com 50% de probabilidade de letalidade (E50) e do coeficiente de Hill (h) das curvas de letalidade obtidos para os grupos experimentais 0° , 30° , 60° e 90° . O E foi expresso como um múltiplo do E_T ($\times E_T$). * Indica diferença estatística significativa deste grupo com o grupo 0° . # Indica diferença estatística significativa deste grupo com o grupo 30° 56

Lista de abreviações e siglas

[Ca ²⁺] _i	18
ΔV _T	44
2a	44
2c	44
ATP	18
ca ²⁺	22
DC	31
E	20
E50	22
EAI	26
EBI	26
ET	22
Feixe AV	17
FV	19
h	46
IC99	46
Krebs	25
LCD	26
LED	29
NCX	18
Nódulo AV	17
nódulo SA	17
NT	25
PA	16
RS	18
SERCA	18
TyrCl	25
V _m	16
xE _T	56
ΔV _{max}	20

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Células excitáveis e atividade elétrica no coração	16
1.2. O papel dos íons cálcio	18
1.3. Arritmias cardíacas e desfibrilação	19
1.4. Eletroporação	21
1.5. Experimentos com células isoladas	22
1.5.1. Dificuldades encontradas na realização de experimentos com células isoladas	23
2. Objetivos	24
3. Materiais e métodos	25
3.1. Preparo de animais e soluções fisiológicas	25
3.1.1. Animais	25
3.1.2. Soluções fisiológicas	25
3.1.3. Isolamento de células	25
3.2. Dispositivos e equipamentos	26
3.2.1. Câmara de perfusão	27
3.2.2. Sistema de microscopia	29
3.2.3. Estimulador elétrico de alta intensidade (EAI)	42
3.2.4. Estimulador elétrico de baixa intensidade (EBI)	42
3.2.5. Comutador	43
3.2.6. Descarte	43
3.2.7. Osciloscópio	43
3.3. Protocolo experimental	43
3.3.1. Limiar de estimulação (E_T)	44
3.3.2. Máxima variação do potencial transmembrana induzida pelo campo elétrico limiar (ΔV_T)	44
3.3.3. Determinação do E letal	45
3.4. Análise estatística dos dados	45
4. Resultados	47
4.1. Instrumentação	47
4.1.1. Sistema de microscopia	47
4.1.2. Movimentação motorizada do charriot	48
4.1.3. Câmara de perfusão com fundo giratório	51
4.2. Resultados experimentais	54

5. Discussão e limitações	58
5.1. Sistema de microscopia com movimentação motorizada do charriot	58
5.2. Câmara de perfusão com fundo giratório	58
5.3. Resultados experimentais	59
5.3.1. Máxima variação do potencial transmembrana no limiar, largura e comprimento.....	59
5.3.2. Campo elétrico limiar	60
5.3.3. Curvas de letalidade	61
6. Conclusão	65
7. Referências	66
Anexos	71

1.Introdução

1.1.Células excitáveis e atividade elétrica no coração

O coração é um órgão muscular do sistema circulatório cuja função é bombear sangue rico em oxigênio por todo o sistema vascular. Em mamíferos, é composto por quatro câmaras: dois átrios e dois ventrículos. O sangue proveniente da circulação sistêmica chega ao coração, por meio das veias cavas, no átrio direito e segue para o ventrículo direito que, em decorrência de sua contração, envia o sangue para os pulmões para a realização de trocas gasosas entre o sangue e o ar. O sangue, agora rico em oxigênio, vindo da circulação pulmonar, volta ao coração por meio das veias pulmonares para o átrio esquerdo, de onde segue para o ventrículo esquerdo que, ao contrair, ejeta esse sangue para a circulação sistêmica, levando nutrientes e oxigênio para todo os órgãos vitais (Silverthorn, 2010; Berne & Levy, 2009). A atividade rítmica e sequencial das contrações das câmaras é fundamental para a eficiência do coração como uma bomba (Guyton & Hall, 2006).

A maior parte do coração é constituída por células musculares (miócitos ou cardiomiócitos) que são eletricamente acopladas por junções comunicantes (*gap-junctions*). Dessas células, cerca de 1% são capazes de gerar atividade elétrica automaticamente, sem influência do sistema nervoso central, coordenando a atividade elétrica dos miócitos por meio da propagação do sinal elétrico através das *gap-junctions* e determinando a frequência dos batimentos cardíacos (Silverthorn, 2010).

A atividade elétrica dessas células, assim como a de outras células excitáveis, como neurônios, advém do fato de apresentarem, em repouso, uma diferença de potencial através de sua membrana (V_m), que é mantida, aproximadamente, constante (cerca de -80 mV para miócitos atriais e ventriculares, Bers, 2001), graças às diferenças entre as concentrações iônicas dos meios intra e extracelular e a permeabilidade seletiva da membrana. Dessa forma, a membrana age como um isolante e permite a passagem, de forma passiva, apenas de moléculas hidrofóbicas, criando um delicado controle de materiais entre os seus compartimentos (Goñi, 2014).

Algumas perturbações (como aquela causada pela estimulação elétrica) são capazes de causar variações do V_m , e, caso essa perturbação cause uma diminuição considerável em sua magnitude (despolarização) até atingir um certo limiar, pode culminar em uma onda que despolariza e repolariza a membrana, chamada de potencial de ação (PA), que é propagado por todo o coração.

As vias de condução do PA no coração podem ser visualizadas na ilustração da Figura 1. As células autoexcitáveis, também conhecidas como células marca-passo, localizam-se no nodo sino-atrial (nodo SA), uma região no átrio direito. A atividade elétrica desenvolvida nessas células não consegue se propagar diretamente para os ventrículos devido à existência de tecido conjuntivo isolante entre essas câmaras, de forma que a única via de passagem inclui o nodo atrioventricular (nodo AV), que, devido ao reduzido número de *gap-junctions*, adiciona um atraso na condução da atividade elétrica, permitindo que os ventrículos permaneçam relaxados enquanto os átrios se contraem, garantindo seu enchimento de forma adequada. Do Nodo AV a atividade elétrica é conduzida por meio do feixe atrioventricular (feixe AV) e deste para as fibras de Purkinje, conduzindo rapidamente a atividade elétrica nos ventrículos do ápice para a base, ejetando o sangue do coração durante a contração (Guyton & Hall, 2006; Silverthorn, 2010).

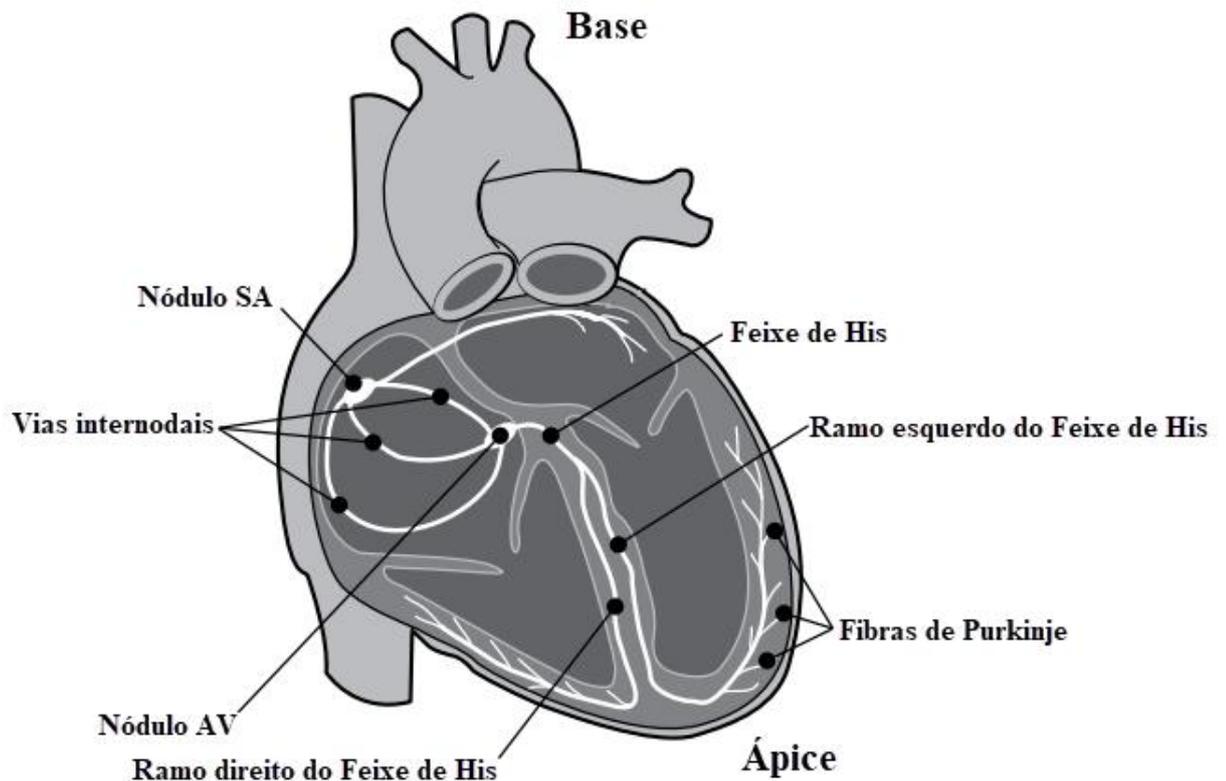


Figura 1. Vias de condução elétrica no coração. (Modificado de Kenny, 2014, número de licença: 4134831090447).

1.2. O papel dos íons cálcio

A eficiência do bombeamento do coração só é obtida quando a atividade elétrica vem coordenada com a atividade contrátil, que ocorre por um processo conhecido como acoplamento excitação-contração.

Nas células cardíacas, a despolarização na membrana causada pelo PA permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, a favor do gradiente de concentração, pela abertura de canais de Ca^{2+} tensão dependentes. A entrada de Ca^{2+} por meio de canais de Ca^{2+} do tipo L induz a liberação de Ca^{2+} , que fica estocado no retículo sarcoplasmático (RS) (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}), aumentando consideravelmente a concentração de Ca^{2+} no meio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Tal aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ favorece a ligação desse íon à troponina C presente nos miofilamentos, permitindo então a interação entre os filamentos de actina e as “cabeças” das moléculas de miosina, necessária para a contração celular. Para que haja o relaxamento celular, é necessário que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduza aos valores basais, por meio de mecanismos de recaptção ou extrusão de Ca^{2+} , como: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), que, em custo de consumo de ATP, repõe o Ca^{2+} em seus estoques; trocador Na^{2+} - Ca^{2+} (NCX) e ATP-ase de Ca^{2+} da membrana (ATP), que expulsa o Ca^{2+} do meio intracelular; captação de Ca^{2+} pela mitocôndria por meio do *uniporter* mitocondrial. O movimento do Ca^{2+} no acoplamento excitação-contração em um cardiomiócito pode ser visualizado no diagrama esquemático da Figura 2. Na parte inferior dessa mesma Figura é representada a relação temporal entre o disparo de um PA, o transiente de concentração de Ca^{2+} e a contração do miócito, evidenciando que a atividade elétrica sempre precede a atividade contrátil.

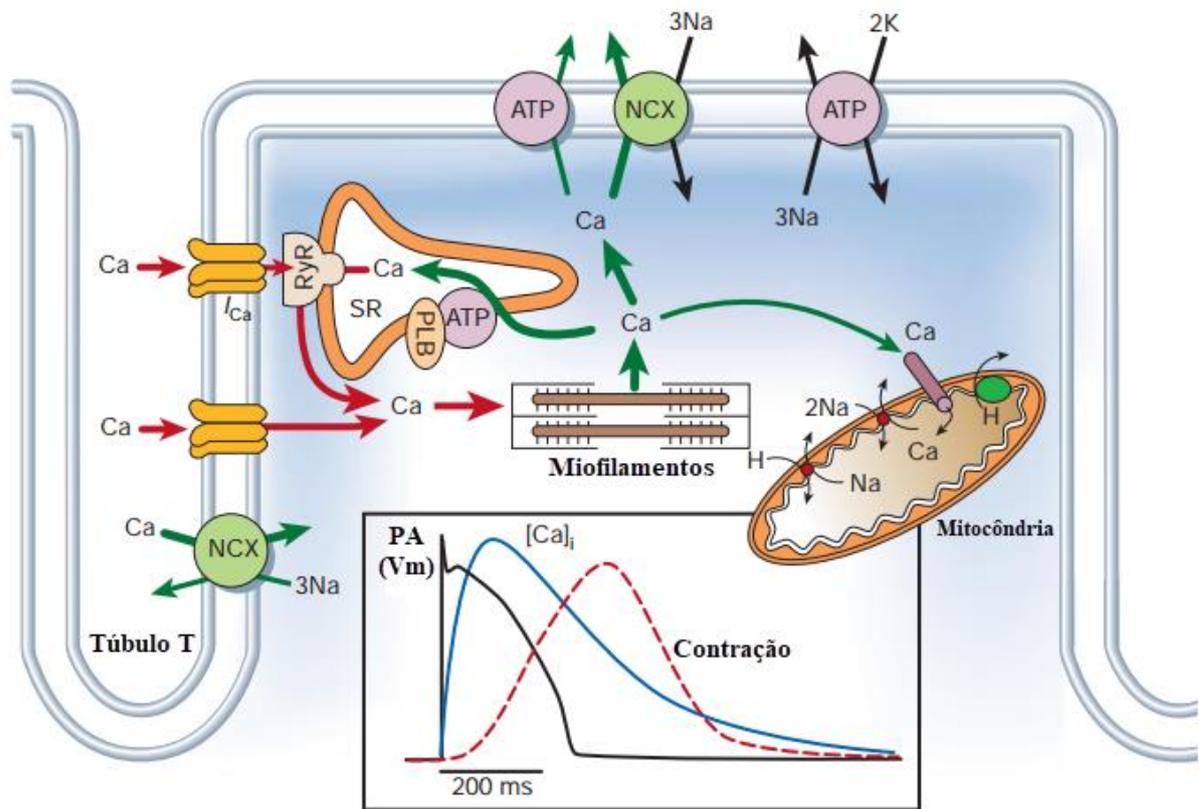


Figura 2. Acoplamento excitação-contrção e relaxamento em um cardiomiócito. No detalhe: relação temporal entre o disparo de um PA, o transiente de concentração citosólica de Ca^{2+} e a contração do miócito. (Adaptado de Bers, 2002. Número de licença: 4134911150458).

1.3. Arritmias cardíacas e desfibrilação

Sob diversas condições patológicas, como, por exemplo, nas doenças cardiovasculares, o coração torna-se sujeito a sofrer alterações em sua atividade elétrica normal (arritmias), comprometendo sua eficiência bombeadora, aumentando o risco de paradas cardíacas e podendo levar à morte (Opie, 1998; American Heart Association, 2017; Nishizaki, 2017). Dentre as arritmias, aquelas que acometem os ventrículos são consideradas as mais graves, por interferirem diretamente no bombeamento de sangue. A fibrilação ventricular (FV), caracterizada pela atividade caótica e assíncrona das células ventriculares, destaca-se como a arritmia mais severa e ameaçadora à vida, podendo levar rapidamente a paradas cardíacas e até mesmo à morte (Turakhia & Tseng, 2007; Dossdall *et al.*, 2010; American Heart Association, 2017). Nos EUA, verificou-se que dentre os casos de paradas cardíacas inexplicadas, metade esteve associada a distúrbios do ritmo cardíaco e que 21% das pessoas que sofreram paradas cardíacas fora do hospital e conseguiram atendimento

de emergência apresentaram FV ou algum distúrbio de ritmo tratável com o uso de desfibriladores externos (American Heart Association, 2017).

A única terapia disponível para reversão da FV é a desfibrilação (Zipes *et al.*, 2006; Weisz, 2009; Crocini *et al.*, 2016), que consiste na aplicação de campos elétricos (E) de alta intensidade diretamente no coração ou através da parede torácica, a fim de restaurar a sincronicidade elétrica de suas células. A aplicação de um E externo gera um gradiente de potencial elétrico no meio extracelular capaz de promover um rearranjo de cargas restrito às faces da membrana celular, mantendo o potencial elétrico do meio intracelular aproximadamente constante, causando assim, variações no V_m . Para as células cardíacas, que podem ser aproximadas por esferoides prolatos (Gomes, 2001), as regiões da membrana mais próximas aos eletrodos são submetidas aos maiores valores de potencial externo e, por isso, são as regiões que apresentam as máximas variações de V_m (ΔV_{max}) (Knisley *et al.*, 1993; Sharma & Tung, 2002; Kotnik *et al.*, 2011). Assume-se em um dos modelos clássicos (Klee & Plonsey, 1976) que a ΔV_{max} é dependente da magnitude do E aplicado, da geometria celular (comprimento e largura da célula), e do ângulo entre a direção de aplicação do E e o eixo maior da célula (θ). Quando o V_m necessário para o disparo do PA é atingido, a célula é excitada e sua despolarização é seguida por um período de refratariedade em que não é capaz de responder a nenhum outro estímulo. O intuito da desfibrilação é fazer com que o maior número de células possível entre nesse período refratário, ao mesmo tempo, para que as frentes de onda que mantêm a FV sejam extintas e o sincronismo do coração possa ser reestabelecido (Zipes *et al.*, 1975; Aidley, 1998; Bers, 2001; Qu, 2006).

Apesar de poder evitar a morte do paciente, permitindo que o coração volte a bombear sangue adequadamente, a desfibrilação pode causar diversos efeitos indesejados sobre o coração, como redução da função contrátil do coração, indução de uma nova FV, danos ao tecido e morte celular (Avitall *et al.*, 1990; Yabe *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1999; Dahl *et al.*, 1974; Oliveira *et al.*, 2008; Fedorov *et al.*, 2008; Dossall *et al.*, 2010; Viana, 2016).

Os efeitos indesejados dos campos elétricos de alta intensidade provenientes da desfibrilação sobre o miocárdio são geralmente associados à perda da permeabilidade seletiva da membrana em decorrência do fenômeno denominado eletroporação (Lown, 1962; Davis, 1975; Babbs *et al.*, 1980; Koning *et al.*, 1980; Van

allen *et al.*, 2003; Fedorov *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2013), resultando em disfunção elétrica e mecânica transiente ou permanente do coração.

1.4. Eletroporação

A estrutura anfifílica das bicamadas lipídicas torna as membranas das células praticamente impermeáveis aos íons. Assim, agem, até um certo grau, como um isolante. Quando campos elétricos são aplicados, cargas livres se movem e se acumulam em suas bordas, criando uma separação de cargas (restrita às faces da membrana) de forma que ela passa ter um comportamento similar a de um capacitor. Quando um E de intensidade alta o suficiente é aplicado e V_m atinge um valor limiar ($\sim 1V$, Kinoshita *et al.*, 1988), abrem-se poros na membrana tornando-a permeável a íons e outras moléculas (Zimmermann *et al.*, 1976; Abidor *et al.*, 1976; Neuman *et al.*, 1982; Tsong, 1991; Weaver 1994; Tung 1996; Krauthamer & Jones, 1997; Nikolski & Efimov, 2005; Dimova *et al.*, 2006; Ivorra, 2010; Klauke *et al.*, 2010; Miklavčič *et al.*, 2010; Kotnik *et al.*, 2012).

Dois tipos de poros podem se formar na bicamada durante a eletroporação (Figura 3). Poros hidrofóbicos são menores, não permitem a passagem de íons, e podem surgir e fechar espontaneamente por agitação térmica dos fosfolipídios que constituem a membrana (Weaver, 1994; Kotnik *et al.*, 2012), porém seu surgimento é favorecido pela aplicação de E. Já os poros hidrofílicos, são maiores, permitem a passagem de íons e moléculas polares, e são formados a partir dos poros hidrofóbicos quando o raio deste último excede um valor crítico, o que é acompanhado pelo encurvamento da bicamada de forma que as cabeças polares dos fosfolipídios formam um poro, permitindo a passagem de diversas moléculas e íons de forma não seletiva pela membrana, dentre eles o íon cálcio (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Lewis, 2003; Smith *et al.*, 2004).

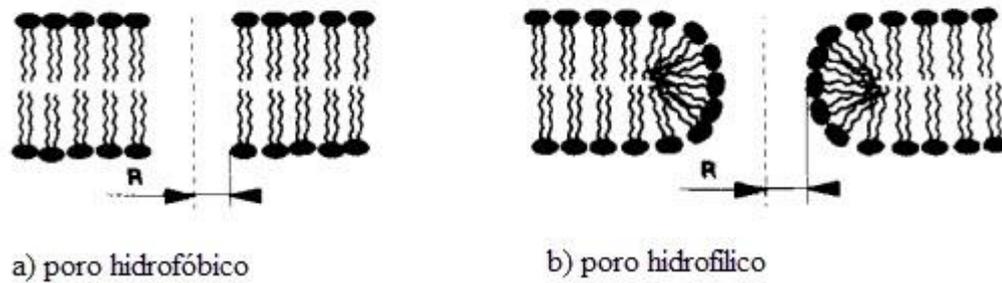


Figura 3. Representação dos tipos de poros que podem ser formados na bicamada lipídica: a) poro hidrofóbico e b) poro hidrofílico (Adaptado de Glaser, 1988, número de licença: 4134811446606).

Acredita-se que o E de alta intensidade cause lesões irreversíveis aos cardiomiócitos, principalmente pelo aumento do influxo de Ca^{2+} através dos poros não seletivos formados na membrana por eletroporação, ocasionando hipercontratura irreversível da célula, além de perda da sua integridade física (morte celular; Knisley & Grant, 1985; Oliveira *et al.*, 2008; Klauke *et al.*, 2009; Goulart *et al.*, 2012).

1.5. Experimentos com células isoladas

A resposta de células cardíacas à aplicação de campos elétricos vem recebendo bastante atenção na literatura, tanto do ponto de vista do entendimento dos aspectos fisiológicos envolvidos, quanto para possíveis aplicações clínicas. Cada célula do coração é independentemente excitável e capaz de disparar seu mecanismo contrátil, e, entender como respondem individualmente aos campos elétricos pode auxiliar no entendimento da resposta do coração como um todo (Bardou *et al.*, 1990; Tung *et al.*, 1991; Gomes, 1997).

Experimentos com células cardíacas isoladas mostraram que o E mínimo capaz de produzir uma contração (E_T , campo elétrico limiar) é cerca de duas vezes maior para células cujo eixo maior está orientado a 90° em relação ao E do que para aquelas orientadas a 0° e que há um aumento gradual do E_T à medida em que se afasta o eixo maior da célula da direção de aplicação do E (Bardou *et al.*, 1990; Tung *et al.*, 1991; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Também foram realizados experimentos acerca da influência da orientação da célula em relação à direção do E sobre a letalidade e verificou-se que a magnitude do E associado a 50% de probabilidade de letalidade (E_{50}) é cerca de duas vezes maior para células orientadas a 90° do que para aquelas orientadas a 0° (Oliveira *et al.*, 2008). Embora tenham sido obtidos

resultados sobre os ângulos que exibem a maior e a menor probabilidade de letalidade (0° e 90°) para um mesmo E, não é possível descrever o comportamento da letalidade celular para ângulos intermediários com apenas esses dois valores, uma vez que o fenômeno pelo qual se acredita que a morte celular ocorra (eletroporação) ainda não é completamente entendido.

Considerando-se que em um coração existem células nas mais diversas orientações, é importante conhecer os valores de campos elétricos que são letais às células miocárdicas em diferentes orientações, a fim de se otimizar os protocolos desfibrilatórios de forma a causar o mínimo possível de lesões aos indivíduos.

1.5.1. Dificuldades encontradas na realização de experimentos com células isoladas

Experimentos com células cardíacas isoladas tendem a ser extensos e onerosos. No Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do CEB/UNICAMP, o processo de isolamento de células dura aproximadamente uma manhã e carece da utilização de diversos materiais de valor elevado. Até que seja iniciado o experimento é gasto aproximadamente 1h com a preparação da câmara com as células isoladas e, quando este tem como foco a aplicação de campos elétricos em uma célula em uma determinada direção, pode levar diversas horas, visto que, após todo o processo de isolamento enzimático das células e sua adesão à câmara de estimulação, o que é feito de modo não controlado, a probabilidade de que ao menos uma célula esteja precisamente posicionada na direção que se deseja é baixa. No caso de não se encontrar uma célula na posição adequada para a realização do experimento é necessário se desfazer da atual preparação e iniciar uma nova, desperdiçando tempo e material. Além disso, ao encontrar uma célula de interesse no interior da câmara (o que é feito movimentando-se o *charriot* do microscópio manualmente), porém continuar percorrendo-a em busca de outras células, torna-se muito difícil retornar àquela célula inicial, visto a dificuldade em se saber o quanto exatamente se percorreu, já que não é feito nenhum tipo de marcação sobre uma célula de interesse presente na câmara de perfusão. Conhecer a posição de uma célula no interior da câmara de perfusão também se torna relevante caso, durante a realização do experimento e sob perfusão, a célula se descole do fundo da câmara. Se a posição de uma outra célula de interesse for conhecida não será desperdiçado tempo com a procura de uma célula adicional.

2. Objetivos

O presente trabalho buscou investigar a influência da orientação celular em relação à direção de aplicação do E de alta intensidade no efeito letal de cardiomiócitos isolados, a fim de verificar se os fenômenos de letalidade e excitabilidade celular possuem comportamentos similares ao se variar a orientação da célula em relação ao E, i.e., um aumento gradual do E à medida em que θ tende para 90° .

Para isso, o projeto consistiu em:

- Desenvolver instrumentação que permitisse a estimulação de cardiomiócitos por E externo em diferentes direções.
 - Projetar e construir um sistema de controle motorizado de *charriot* de microscópio, de forma que se torne possível armazenar e recuperar posições de células no interior da câmara de perfusão.
 - Projetar e construir uma câmara de perfusão com fundo giratório, a fim de se posicionar células no interior da câmara em diferentes direções em relação à direção de aplicação do E.
- Construir curvas de letalidade em função do E aplicado para as direções 0° , 30° , 60° e 90° em relação ao eixo maior celular (Figura 4).

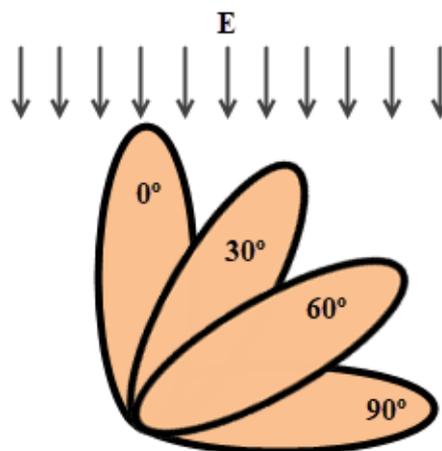


Figura 4. Representação de cardiomiócito cujo eixo principal (maior) está orientado a 0° , 30° , 60° e 90° em relação a direção de aplicação do E.

3. Materiais e métodos

3.1. Preparo de animais e soluções fisiológicas

3.1.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados miócitos ventriculares isolados de ratos Wistar machos adultos (4-6 meses de idade) provenientes do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB-UNICAMP). Os animais ficaram alojados em gaiolas coletivas (até 3 animais por gaiola) e receberam água e ração à vontade, sendo submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 horas. Até o dia em que foram utilizados para experimentos, os animais foram manipulados apenas para a realização da limpeza das gaiolas.

Todo o procedimento experimental com animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolo no.4093-1(K)).

3.1.2. Soluções fisiológicas

Na composição das soluções, as concentrações dos solutos estão apresentadas em mM.

- **Solução de Tyrode Normal (NT, mM):** NaCl 140; KCl 6; MgCl₂.6H₂O 1,5; ácido N-2 hidroxietilpiperazina-N"-2 etano-sulfônico HEPES 5; glicose 11,1; CaCl₂.2H₂O 1. (Utilizada para perfusão dos miócitos durante os experimentos).
- **Solução de Krebs-Henseleit (Krebs, mM):** NaCl 115; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 2,4; glicose 11,1. (Utilizada para isolamento das células).
- **Solução de Tyrode modificada (TyrCl, mM):** NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 2,5; HEPES 10; glicose 11. (Utilizada para isolamento das células).
- **Solução cardioplégica (mM):** KCL 30; KH₂PO₄ 10; MgCl₂.6H₂O 1; HEPES 10; glicose 11; taurina 20; ácido glutâmico 70. (Utilizada para o isolamento das células)

3.1.3. Isolamento de células

O isolamento de miócitos do ventrículo esquerdo foi realizado por digestão enzimática do coração (Penna & Bassani, 2010). Resumidamente, cada animal foi sacrificado por exsanguinação sob anestesia profunda com isoflurano. Depois de removido o coração, a aorta foi canulada e o coração perfundido durante 4-5 minutos

com solução de Krebs. Em seguida, adicionou-se colágenase tipo I (0,4-0,5 mg/ml; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) a esta solução e o coração foi perfundido por mais 15-20 minutos. Para interromper a digestão enzimática, realizou-se perfusão do coração com TyrCl contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml; Calbiochem, San Diego, CA, EUA) durante aproximadamente 10 minutos. Por fim, o ventrículo, após dissecado, foi delicadamente agitado em solução cardioplégica para dissociação das células.

3.2. Dispositivos e equipamentos

O diagrama de blocos da montagem experimental encontra-se na Figura 5. Os miócitos são colocados na câmara de perfusão/estimulação (Figura 5 - A) para que sejam visualizados na tela do computador (Figura 5 - B), após a amplificação da imagem pelo sistema de microscopia (Figura 5 - C). A solução utilizada para perfusão das células que estão na câmara de perfusão fica em um reservatório (Figura 5 - D), conectado à câmara, cuja saída está ligada ao sistema de vácuo (Figura 5 - E). Estimuladores de alta (EAI, Figura 5 - F) e de baixa (EBI, Figura 5 - G) intensidades foram ligados a um comutador (Figura 5 - H) e sua saída conectada à câmara de perfusão/estimulação, ou seja, as células podiam ser estimuladas pelo EBI ou pelo EAI dependendo da posição do comutador. Para medir a tensão nos terminais de cada estimulador, foi utilizado um osciloscópio (Figura 5 - I). Motores de passo e um motor DC foram acoplados mecanicamente ao *charriot* do microscópio e à câmara de perfusão (Figura 5 - J), respectivamente, para que tivessem seu controle realizado de forma automatizada. Os circuitos construídos e utilizados para tal controle, bem como um LCD e 12 botões para comunicação com o usuário foram adaptados a uma caixa (Figura 5 - K).

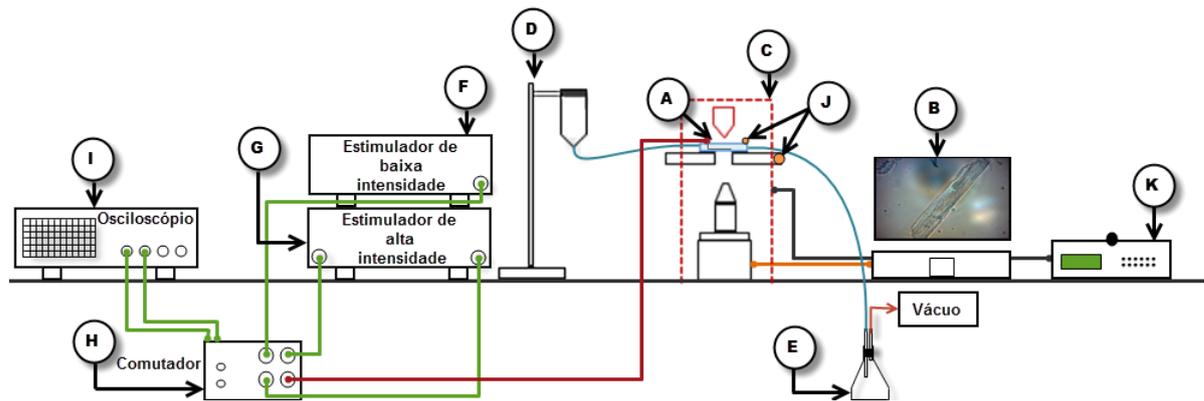


Figura 5. Diagrama de blocos da montagem experimental: A) câmara de perfusão; B) computador; C) sistema de microscopia; D) suporte com reservatório contendo solução de Tyrode; E) descarte ligado ao sistema de vácuo; F) estimulador elétrico de alta intensidade (EAI); G) estimulador elétrico de baixa intensidade (EBI); H) comutador; I) osciloscópio; J) motor DC acoplado à câmara de perfusão e motores de passo acoplados ao *charriot* do microscópio; K) caixa contendo os circuitos para controle dos motores que permitem o giro do fundo da câmara de perfusão e a movimentação do *charriot* do microscópio.

3.2.1. Câmara de perfusão

Foi projetada e construída uma câmara de acrílico transparente com fundo giratório para perfusão e estimulação de miócitos. Como pode ser visualizado na Figura 6, a câmara possui carcaça cilíndrica com altura total de 30 mm e 75 mm de diâmetro.

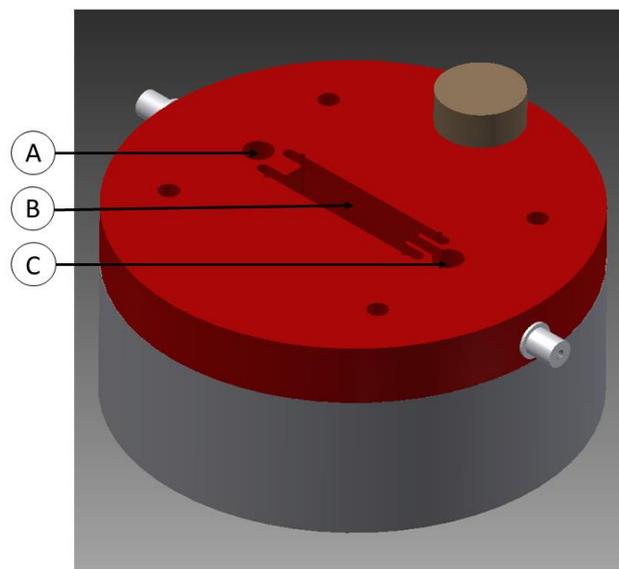


Figura 6. Vista externa da câmara de perfusão e regiões de interesse. A) Cata-bolhas; B) região para deposição de miócitos; C) região de saída de solução.

Um maior detalhamento pode ser visto na Figura 7, por meio de uma vista explodida. A câmara foi construída sobre um suporte quadrado, a fim de garantir sua estabilidade e acoplamento ao microscópio. Sua parte superior (Figura 7 - A, 1) foi

baseada em uma câmara projetada por Gomes (Gomes, 1997), sendo formada por 3 regiões: a primeira consiste em um cata bolhas que evita que bolhas de ar sigam junto com a solução para a região onde os miócitos serão depositados (Figura 6 - A); a região seguinte é aproximadamente retangular (25 mm X 9 mm) (Figura 6 - B) e possui espaços, localizados nas paredes laterais internas, para colocação de eletrodos (platina; 0,5 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento), possibilitando uma distribuição uniforme do E no seu interior, que pode ser aproximado ao de um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes, Bassani & Bassani, 2001; Oliveira *et al.*, 2008). Portanto, o E pode ser calculado pela expressão 1:

$$E = \frac{V}{d} \quad [1]$$

Onde V é a diferença de potencial aplicada e d é a distância entre os eletrodos. A última região consiste em um degrau ligado à saída da câmara, com o objetivo de evitar que a região, onde as células são depositadas, seque caso o fluxo da solução diminua (Figura 6 - C). Ainda na parte superior, encontram-se conectores de entrada (Figura 7 - A, 2) e de saída (Figura 7 - A, 3) para que sejam conectados ao reservatório com solução e ao sistema de vácuo, respectivamente. Um *knob* foi mecanicamente acoplado na parte superior da câmara (Figura 7 - A, 4) e a uma engrenagem menor (Figura 7 - C, 3) para possibilitar o giro do fundo da câmara (Figura 7 - C, 1), onde uma lamínula de vidro (Figura 7 - B, 1) de 25 mm de diâmetro está colada. O fundo da câmara está conectado por meio de parafusos a uma engrenagem maior (Figura 7 - C, 2), que está acoplada à engrenagem menor, pela qual o movimento do *knob* é transmitido. Portanto, à medida que o *knob* é rotacionado, a lamínula de vidro contendo a amostra de miócitos também é rotacionada em uma relação 2,5: 1. Dois o-rings (Figura 7 - B, 2) são utilizados para evitarem vazamentos entre as peças, principalmente durante a rotação da lamínula.

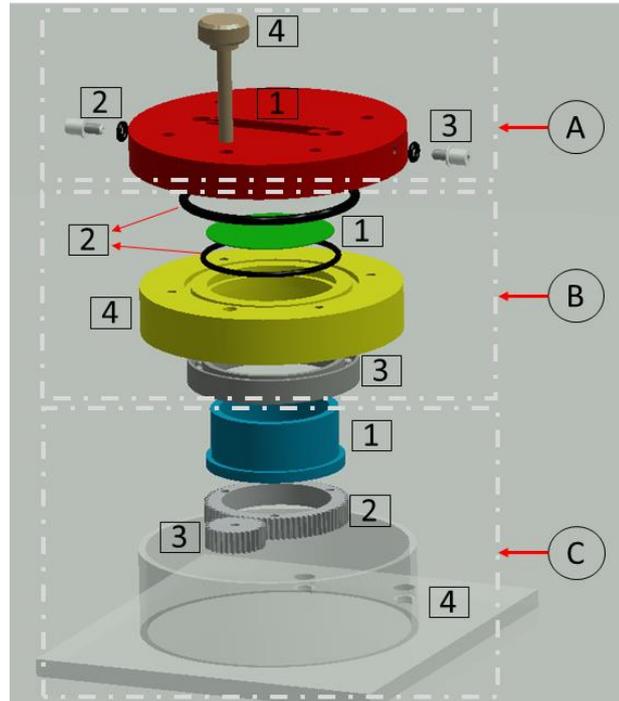


Figura 7. Vista explodida da câmara de perfusão. A) Parte superior da câmara contendo catódo, região para deposição de miócitos e região de saída de solução (1), conectores para entrada e saída de solução (2 e 3) e knob (4); B) lamínula de vidro (1), O-Rings (2) e peças de suporte (3); C) suporte para a lamínula (1), engrenagem acoplada ao fundo da câmara (2), engrenagem conectada ao knob (3) e suporte final da câmara (4).

3.2.2. Sistema de microscopia

A base de um microscópio não invertido Nikon foi adaptada para um sistema de microscopia invertida, a fim de realizar os experimentos com células. A câmara de estimulação/perfusão foi colocada sobre o estágio xy (*charriot*) do microscópio (Figura 8 - C) que possui iluminação por meio de um LED (*light emitting diode*) branco de alta luminância (*Super Bright LED*, Jumbo, 5000 mcd, 1,85V, 20 mA, Archer, N. Cat. 276 - 086) alimentado por uma bateria de 9V, localizada na parte superior (Figura 8 - A), de modo que a luz atravessa a amostra contida na câmara (Figura 8 - B), atingindo a objetiva (Figura 8 - E), e é projetada no sensor da *webcam* (Figura 8 - D), que está acoplada ao microscópio e conectada a um computador para a visualização das células.

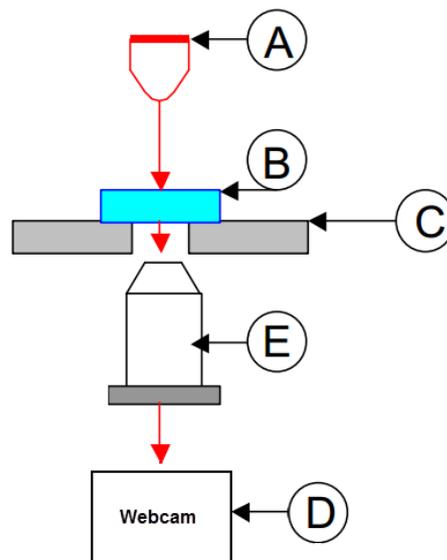


Figura 8. Detalhe da parte óptica do sistema de microscopia: A) LED; B) câmara de perfusão; C) *charriot* com ajuste de foco; D) webcam; E) objetiva. (Modificado de Oliveira, 2004).

3.2.2.1. Controle do *charriot* do microscópio e do fundo da câmara de perfusão

O diagrama de blocos simplificado apresentando o controle do *charriot* e do giro do fundo da câmara pode ser visualizado na Figura 9, enquanto o diagrama de blocos detalhado do circuito completo desenvolvido para tal controle está representado na Figura 10.

Dois motores de passo bipolares (Figura 10 - A), com ângulo de deslocamento de $3,6^\circ$ por passo e funcionando em modo de acionamento de passo completo foram adaptados mecanicamente ao sistema de microscopia, a fim de que o *charriot* do microscópio pudesse ser movimentado por meio de comandos de um microcontrolador (Figura 10 - B), de modo que a localização, o armazenamento e a recuperação das posições de miócitos fossem possíveis, facilitando a execução de experimentos. Para automatizar o uso da câmara de perfusão e melhorar a precisão do posicionamento das células durante os experimentos, um motor DC (Figura 10 - C) foi acoplado à câmara de perfusão desenvolvida, de forma que a rotação da lamínula contendo os miócitos também fosse realizada via microcontrolador. Um encoder óptico (Figura 10 - D) foi utilizado juntamente ao motor DC com o objetivo de verificar/garantir seu posicionamento.

O controle dos motores de passo e do motor DC foi feito com o auxílio de drivers L298N (Figura 10 - E), onde cada driver possui internamente duas pontes H para permitir a inversão do sentido da corrente do motor de passo e do motor DC.

Para auxiliar o controle do movimento do *charriot* e o giro do fundo da câmara, foi construída uma interface com o usuário composta por um joystick (Figura 10 - F), um LCD (Figura 10 - G) e doze botões do tipo chave tátil (Figura 10 – H, I), que foram posteriormente adaptados a uma caixa (Figura 5- K).

A interface formada pelos botões é similar a um teclado matricial com duas linhas e seis colunas, onde, na primeira linha encontram-se os botões utilizados para o armazenamento e recuperação de posições (Figura 10 - H). Na segunda linha estão os botões utilizados para que o usuário realize o giro do fundo da câmara de forma automatizada (Figura 10 - I). O LCD, modelo JHD539M de 64 caracteres, foi utilizado como forma de comunicação com o usuário, a fim de informar se os botões já possuíam posições de miócitos armazenadas e, neste caso, perguntar se ele deseja sobrescrever alguma posição, informar que a objetiva está próxima às laterais da câmara a fim de evitar colisão e para realizar a entrada dos dados necessários para o giro do fundo da câmara. O joystick, composto internamente por dois potenciômetros e uma chave, é utilizado para selecionar a direção (x ou y) em que o *charriot* pode ser movimentado, no plano horizontal.

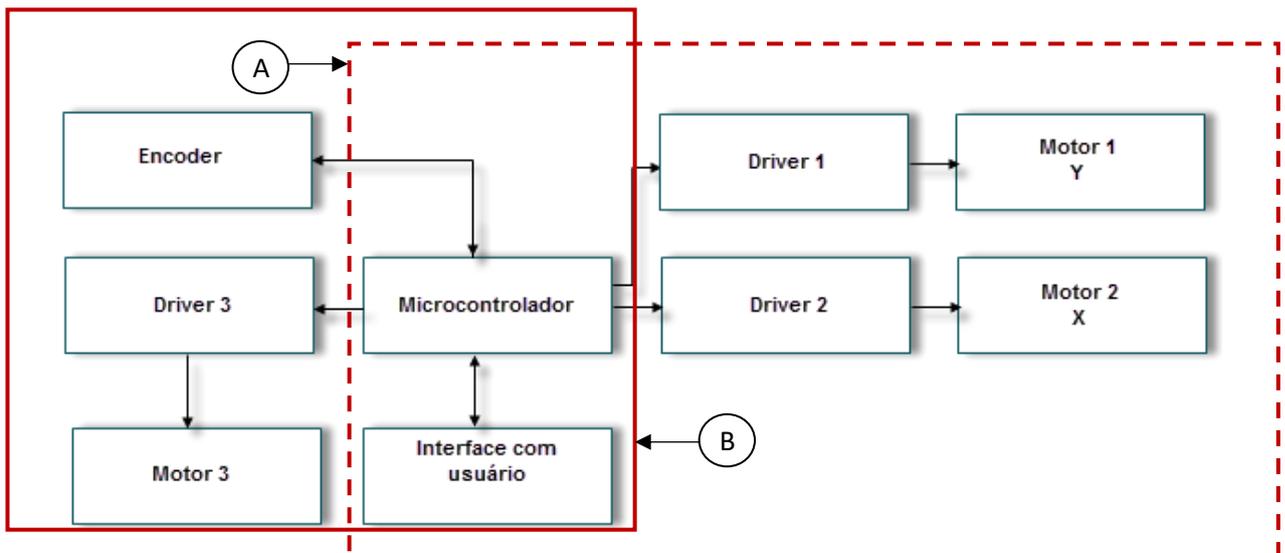


Figura 9. Diagrama de blocos simplificado para: A) controle do *charriot*, composto por dois motores de passo controlados por meio de drivers, um microcontrolador e uma interface com o usuário; B) Controle do giro do fundo da câmara de perfusão, composto pelo mesmo microcontrolador, um motor DC controlado por meio de um driver e um encoder para posicionamento do motor DC.

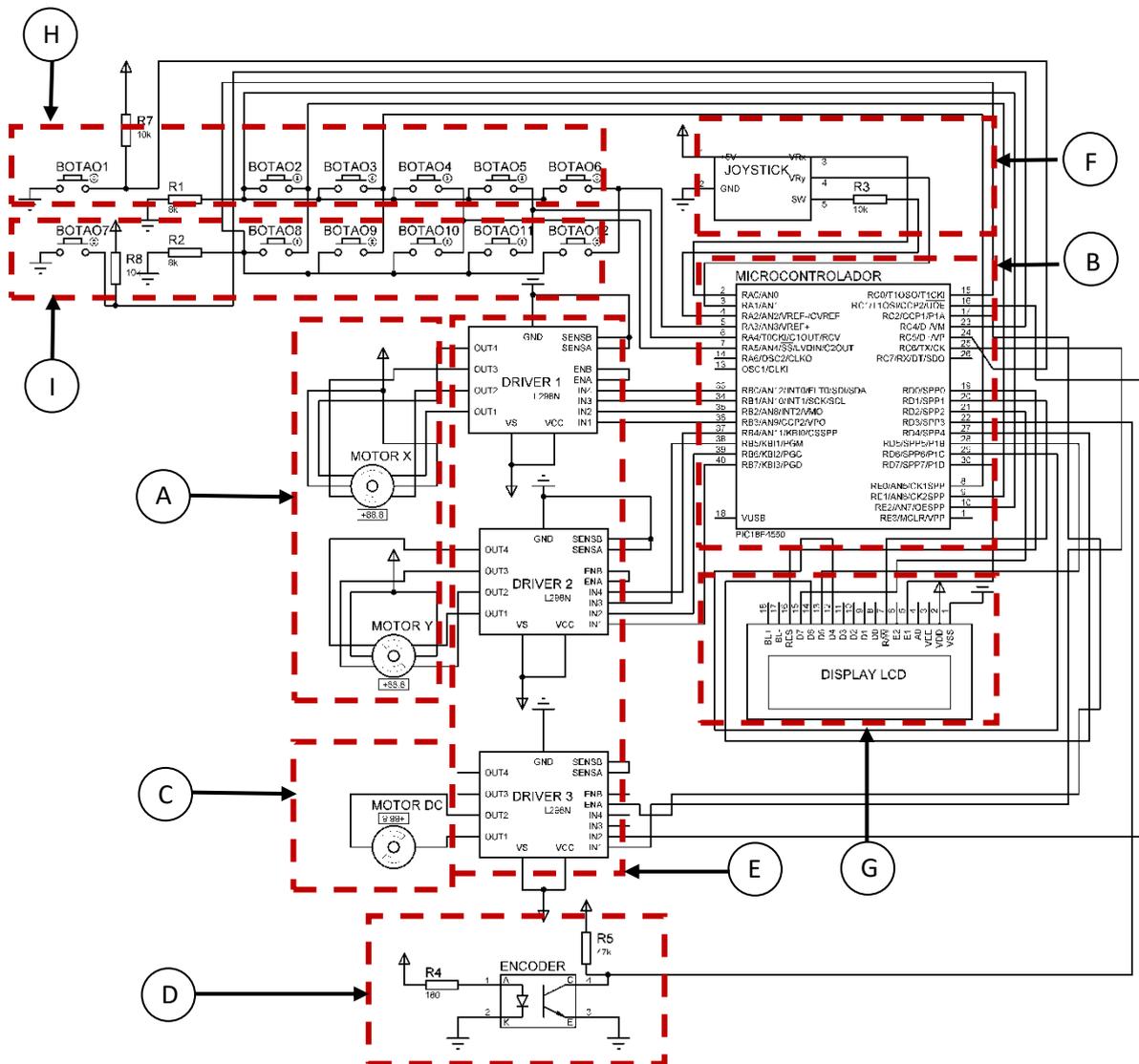


Figura 10. Circuito desenvolvido para o controle da movimentação do *charriot* e do giro do fundo da câmara de perfusão: A) Motores de passo bipolares; B) microcontrolador; C) motor DC; D) optoacoplador do encoder utilizado para verificação da posição do motor DC; E) drivers para controle dos motores de passo e do motor DC; F) joystick para movimentação do *charriot*; G) LCD; H) botões utilizados para armazenamento/recuperação de posições de miócitos; I) botões utilizados para inserção de dados relacionados ao giro do fundo da câmara.

O Microcontrolador utilizado foi o PIC18F4550 (Microchip Technolgy Inc., Chandler, AZ, USA) com um cristal de 20 MHz. O software foi desenvolvido em C no ambiente de desenvolvimento MPLAB IDE® (Microchip Technolgy Inc., Chandler, AZ, USA) e sua compilação foi realizada pelo compilador XC8 (Microchip Technolgy Inc., Chandler, AZ, USA). Na figura 11 pode ser visualizado o fluxo de execução geral do software desenvolvido.

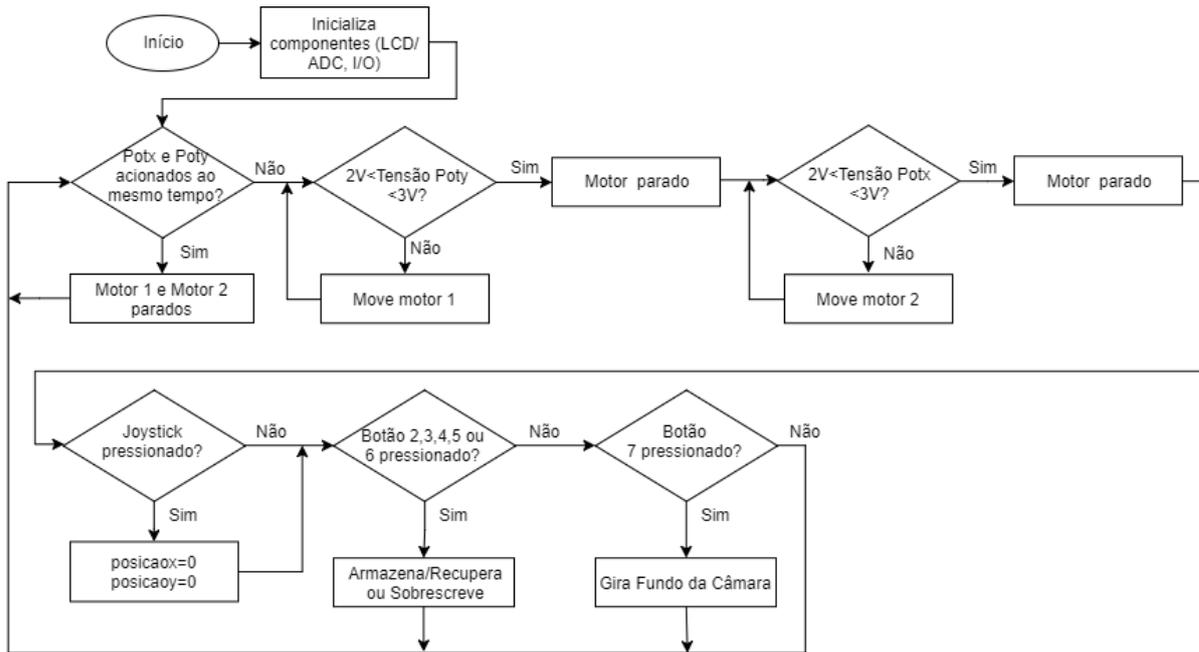


Figura 11. Fluxo de execução do software responsável pelo controle do charriot, do armazenamento e recuperação de posições e da rotação do fundo da câmara de perfusão. **Poty** é o potenciômetro associado a movimentação do motor no eixo y (motor 1) e **Potx** é o potenciômetro associado a movimentação do motor no eixo x (motor 2). **posicaooy** e **posicaoox** são as posições atuais em passos associadas aos motores 1 e 2, respectivamente. Os botões 2, 3, 4, 5 e 6 são utilizados para armazenamento e recuperação de posições, enquanto o botão 7 é utilizado para indicar que existe uma célula a ser rotacionada.

O sistema é iniciado e a primeira tarefa do *software* é verificar se há movimentação do joystick, por meio da medida de tensão nas portas analógicas do microcontrolador associadas a cada um dos dois potenciômetros internos do *joystick*, para que então possam ser acionados os motores de passo responsáveis pela movimentação do *charriot* do microscópio. Primeiramente, o programa verifica se os dois potenciômetros estão sendo acionados simultaneamente, isto é, se o joystick está sendo movimentado em alguma diagonal, e, caso positivo, os motores permanecem parados. Caso negativo, o programa verifica se a tensão aplicada no potenciômetro responsável pelo acionamento do motor 1 (poty) está entre 2V e 3V (posição de repouso do poty). Caso negativo, significando que o motor deverá ser movimentado, é chamada a sub-rotina **“Move motor 1”**, responsável pelo acionamento das bobinas do motor 1, descrita na Figura 12. Caso positivo, o motor 1 fica parado, chama-se a sub-rotina **“motor 1 parado”** e dá-se continuidade ao programa verificando-se a tensão no potenciômetro responsável pelo acionamento do motor 2 (potx). Caso ele não esteja em sua posição de repouso (2V-3V), é chamada a sub-rotina **“Move motor**

2” (Figura 13) e, caso contrário, é chamada a sub-rotina “**motor 2 parado**”. Vale ressaltar que a cada passo do motor é realizado o incremento (caso o motor gire no sentido horário) ou decremento (caso o motor gire no sentido anti-horário) da variável que contém a posição atual em que o motor se encontra (**posicaooy** para o motor 1 e **posicaoox** para o motor 2). O passo seguinte consiste em verificar se o botão presente internamente no joystick foi pressionado. Caso positivo, indicando que a câmara de perfusão está centralizada com a objetiva (ponto marcado com uma caneta nanquim com ponta de 50 µm e que pode ser focalizado com a objetiva), as variáveis **posicaoox** e **posicaooy** são zeradas. Em seguida, dá-se início ao processo de armazenamento e recuperação de posições (Figura 14), que depende dos valores contidos em **posicaooy** e **posicaoox**. O programa verifica se algum dos botões 2, 3, 4, 5 ou 6 (da linha 1 da matriz de botões) foi pressionado. O último passo consiste em verificar se o usuário pressionou o botão 7, indicando que a célula nas atuais posições x e y é aquela que será rotacionada em relação ao E. Caso positivo, é chamada da sub-rotina “**Gira Fundo da Câmara**” (Figura 15). Caso o botão 7 não tenha sido pressionado, o programa volta diretamente para o seu início.

As sub-rotinas “**motor 1 parado**” e “**motor 2 parado**” consistem simplesmente em colocar nível lógico zero nas portas RB0 a RB7 do PIC para que o acionamento de cada motor seja impossibilitado, visto que não haverá fluxo de corrente pelo driver. O motor fica parado sempre que a tensão medida no potenciômetro do *joystick* estiver entre 2 e 3 V, posição de repouso do *joystick*.

Na Figura 12 pode ser visto o fluxograma da sub-rotina “**Move motor 1**”. Pode-se perceber que o movimento do motor em um dado sentido depende da tensão medida no potenciômetro interno do joystick e também da posição em que o motor se encontra.

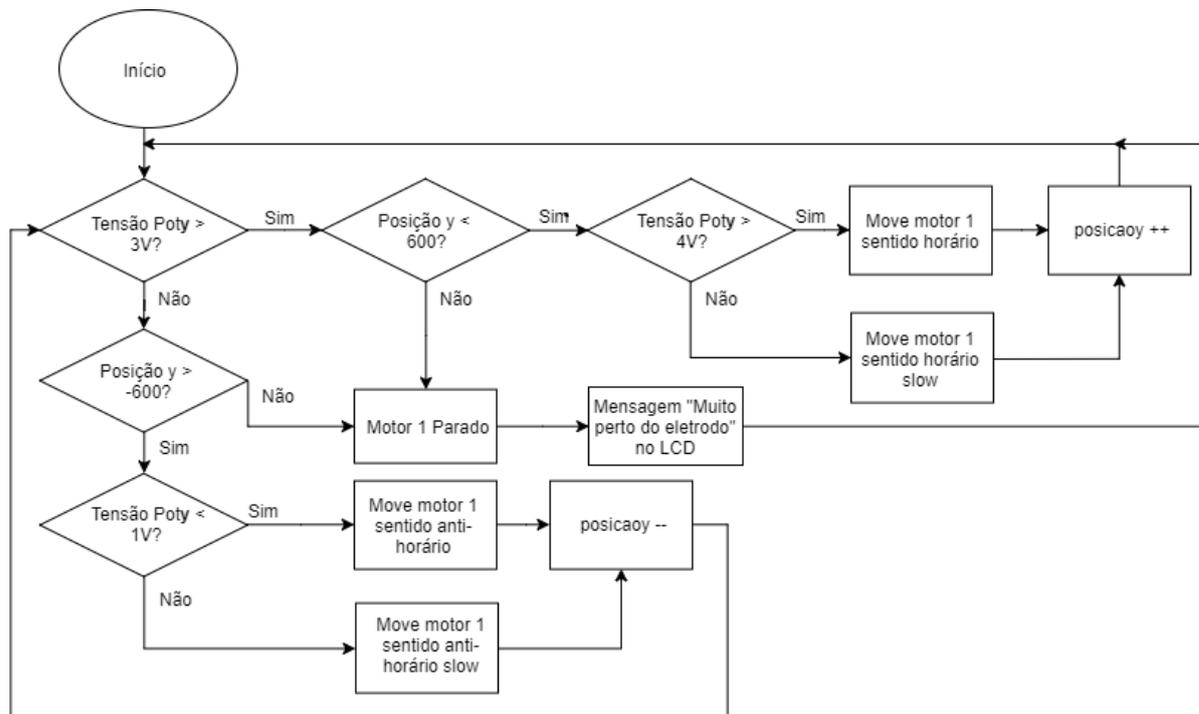


Figura 12. Fluxograma referente à sub-rotina “Move motor 1”. **Poty** é o potenciômetro associado à movimentação do motor no eixo y (motor 1) e **posicaooy** é a posição atual em passos associada a este mesmo motor.

Foi realizada uma limitação por *software*, a fim de que a objetiva não colidisse com a câmara e para que as células utilizadas não estivessem muito próximas aos eletrodos. Além disso, essa limitação também foi responsável por definir uma área de trabalho em formato circular, com 600 passos de raio, garantindo que todas as células pudessem ser giradas sem sair da região útil da câmara. Assim, partindo do centro da câmara (posição 0,0), pode-se deslocar aproximadamente ± 600 passos em Y sem que haja nenhuma colisão.

Caso a **posiçãooy** esteja no limite e o joystick for ativado no sentido de avançar o limite, o motor pára e aparece a mensagem “Muito perto do eletrodo” no LCD, e o movimento do motor só é permitido na direção contrária.

Caso **posicaooy** esteja dentro do limite, o motor 1 gira no sentido horário, deslocando o *charriot* para frente, se a tensão medida no poty for maior que 3 V, ou gira no sentido anti-horário, deslocando o *charriot* para trás, se a tensão for menor que 2V. A velocidade de giro do motor também é determinada pela tensão medida no poty, de forma que se está tensão for maior que 4V ou menor que 1V, o motor gira mais

rápido. A **posição y** é incrementada a cada passo do motor no sentido horário e decrementada a cada passo no sentido anti-horário.

A Figura 13 mostra o fluxograma da sub-rotina “**Move motor 2**”, que tem funcionamento muito semelhante a “**Move motor 1**”, com a exceção de que o motor 2 movimenta o *charriot* para direita e para esquerda, podendo percorrer, a partir do centro da câmara (posição 0,0), ± 600 passos. Quando as posições ± 600 são atingidas, a mensagem “Fim de curso” é mostrada no LCD.

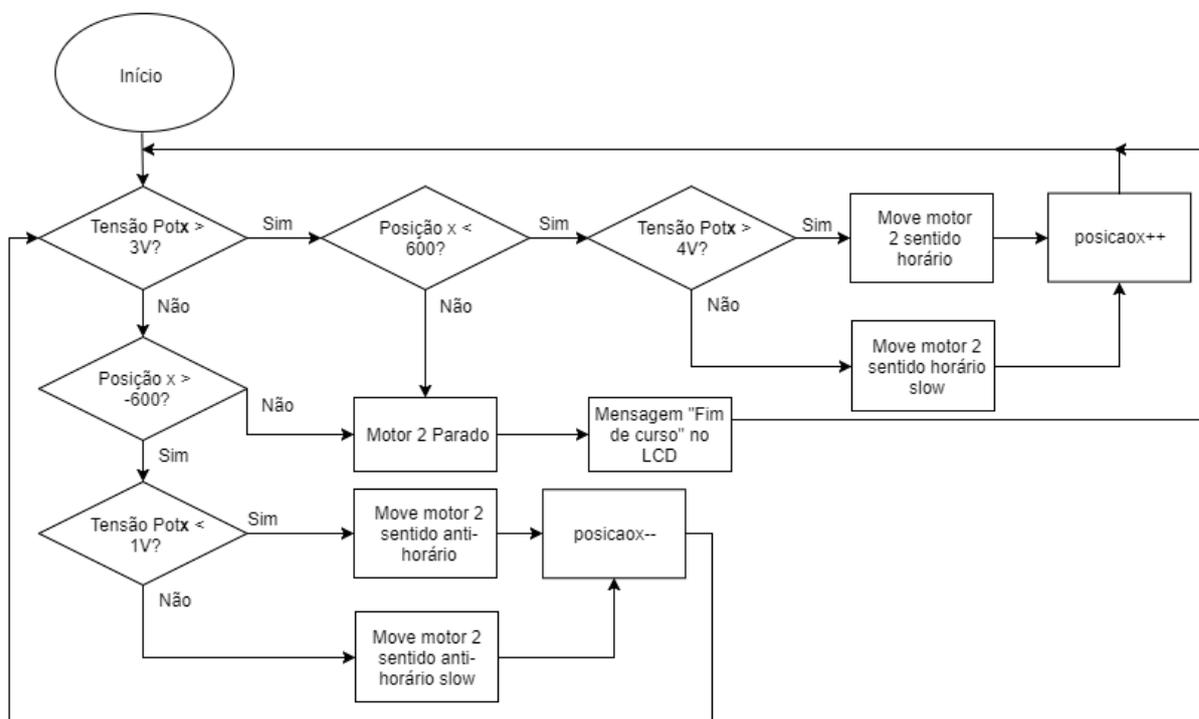


Figura 13. Fluxograma referente à sub-rotina “Move motor 2”. **Potx** é o potenciômetro associado à movimentação do motor no eixo x (motor 2) e **posicaoox** é a posição atual em passos associada a este mesmo motor.

É importante observar que o acionamento dos motores de passo representados nos fluxogramas 12 e 13 por “**Move motor 1 sentido horário/ sentido horário slow**”, “**Move motor 1 sentido anti-horário/ sentido anti-horário slow**”, “**Move motor 2 sentido horário/ sentido horário slow**” e “**Move motor 2 sentido anti-horário/ sentido anti-horário slow**” é dependente da forma com que as suas bobinas são energizadas. Assim, o sentido de movimento do motor de passo pode ser representado pelo sentido com que se percorre os estados mostrados na tabela 1 onde, percorrendo os estados de cima para baixo o motor se movimenta no sentido

horário e percorrendo-os de baixo para cima, o motor se movimenta no sentido anti-horário. Os estados correspondem a diferentes combinações de níveis lógicos aplicados nas portas digitais do PIC, sendo responsáveis pelo acionamento de cada motor pelos drivers. A tabela apresentada corresponde ao modo de acionamento passo-completo de um motor de passo bipolar.

Tabela 1. Modo de acionamento de um motor de passo em modo passo completo. A e A' representam os terminais de uma bobina e B e B' representam os terminais de outra bobina do motor.

Estado	Níveis lógicos			
	A	A'	B	B'
1	0	1	1	0
2	0	1	0	1
3	1	0	0	1
4	1	0	1	0

Para o entendimento do armazenamento e recuperação das posições de miócitos na câmara, é apresentado o fluxograma da Figura 14. Foram utilizados seis botões que possuem tratamento de *debounce* (possível oscilação do sinal ao pressionar a tecla) por software, a fim de evitar acionamentos acidentais.

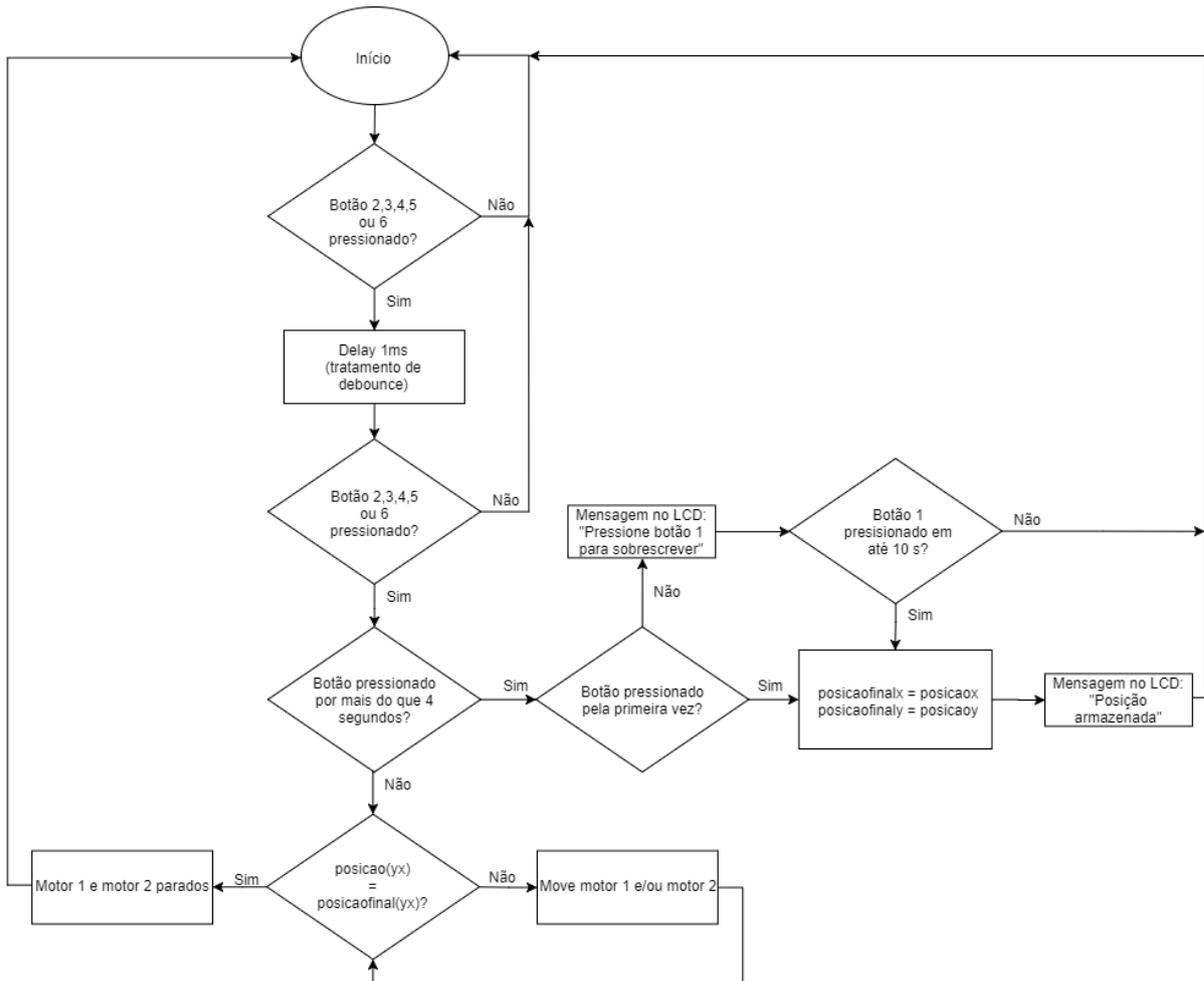


Figura 14. Fluxograma referente ao armazenamento e recuperação de posições. Os botões 2, 3, 4, 5 e 6 são botões utilizados para configurar armazenamento e recuperação de posições de miócitos. O botão 1 é utilizado para confirmar que se deseja sobrescrever uma dada posição previamente armazenada por algum outro botão.

Cada botão possui associado a si duas variáveis para armazenar a posição desejada em x e em y (**posicaofinalx** e **posicaofinaly**), assim, quando algum dos botões relacionados ao armazenamento de posições (botões 2, 3, 4, 5 ou 6) é pressionado, pela primeira vez, por mais do que 4 segundos, os valores atuais referentes às posições em x (**posicaoax**) e em y (**posicaoy**) são armazenados nas variáveis associadas daquele botão e uma mensagem de confirmação de armazenamento é mostrada no LCD. Caso o usuário tente armazenar uma posição em um botão que já está sendo utilizado, uma mensagem é mostrada no LCD solicitando que o usuário pressione o botão 1 em até 10 segundos para sobrescrever a posição contida ali. Porém, se o tempo de pressionamento do botão foi menor do que 4 segundos, o que significa que o usuário deseja recuperar alguma posição que

já foi armazenada, são chamadas as sub-rotinas “**Move motor 1**” e/ ou “**Move motor 2**”, descritas previamente, responsáveis pelo acionamento dos motores de passo, até que a posição atual em x e y corresponda as posições previamente armazenadas de x e y, ou seja, até que **posicao_x = posicao_{finalx}** e **posicao_y = posicao_{finaly}**. Quando essa condição é alcançada os motores param de girar.

A fim de verificar que a recuperação de posições ocorria de forma satisfatória, foi realizado um teste com cada motor, com o auxílio de uma graticula de vidro de precisão de 10 μm , de forma que, partindo-se sempre de um mesmo ponto, um determinado número de passos (10, 50, 100 e 150 passos) deveria ser percorrido e a medida associada a este número de passos (em μm) era tomada com um software de edição de imagens. O procedimento foi repetido 10 vezes para cada conjunto de passos para cálculo de média e desvio padrão.

Por fim, o fluxograma da sub-rotina “**Gira Fundo da Câmara**” pode ser visualizado na Figura 15. Apenas caso o botão 7 tenha sido previamente pressionado, uma mensagem solicitando que o usuário insira os parâmetros para a rotação é mostrada no LCD. O usuário utiliza o botão 8 (botão de sinal) para selecionar se o valor a ser adicionado é positivo ou negativo, e utiliza os botões 9 e 10 para adicionar o valor em passos de 1 ou 10, respectivamente, conforme for desejado. Ao terminar de inserir o valor correspondente ao ângulo inicial da célula o usuário deve pressionar o botão 11 para que o valor seja atribuído à variável apropriada e para que seja solicitado, através de outra mensagem no LCD, o ângulo final desejado para a célula em questão. O valor correspondente a esse ângulo deve ser inserido da mesma forma que foi feito para o ângulo inicial e o botão 11 deve ser novamente pressionado para atribuição do valor à sua devida variável no programa. Finalmente, para que se dê início ao giro do fundo da câmara, é necessário que se pressione o botão 7.

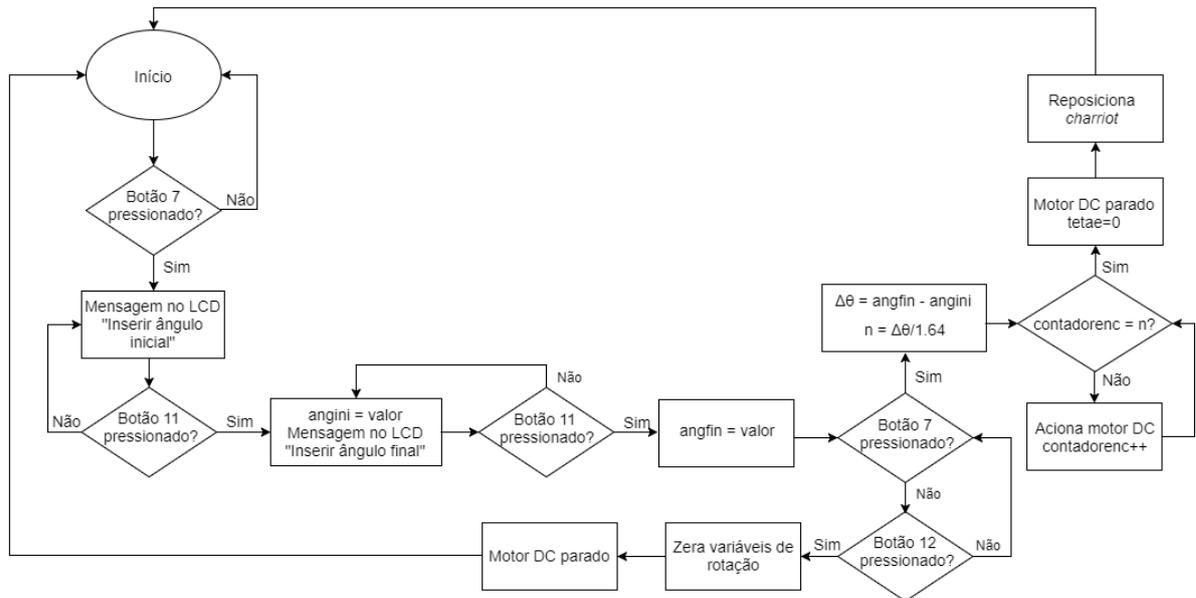


Figura 15. Fluxograma da sub-rotina “Gira Fundo da Câmara”. Os botões 7, 11 e 12 são botões associados ao giro do fundo da câmara de perfusão presentes no sistema de controle de *charriot*. A variável *contadorenc* é responsável por armazenar o número de pulsos provenientes do foto-transistor, cujo valor deve se igualar ao número de pulsos total (*n*) necessários para que o fundo da câmara seja rotacionado no ângulo desejado.

O eixo do motor DC utilizado para o giro do fundo da câmara foi acoplado mecanicamente a um encoder, de forma que a cada sinal alto proveniente do foto-transistor, uma variável (**contadorenc**) do programa é incrementada. Após a inserção dos valores correspondentes aos ângulos inicial e final da célula, o programa calcula a variação de ângulo que a célula sofrerá, por meio da diferença entre ângulo final e ângulo inicial, e a armazena na variável $\Delta\theta$. Caso $\Delta\theta$ seja maior que zero, o motor gira no sentido anti-horário (e o fundo da câmara gira no sentido horário) e, caso $\Delta\theta$ seja menor do que zero, o motor gira no sentido horário (e o fundo da câmara no sentido anti-horário). Uma vez que o encoder possui uma precisão de $1,64^\circ$, foi possível relacionar o número de acionamentos do foto-transistor (*n*) à variação de ângulo desejada ($\Delta\theta$), como mostrado na equação 2. Essa relação foi verificada teoricamente pela relação de engrenagens e experimentalmente a partir da análise do número de pulsos necessários para que o fundo da câmara realizasse uma volta completa. Assim, para que a célula seja girada em $\Delta\theta$ graus, o motor é acionado (na direção determinada pelo sinal de $\Delta\theta$) até que **contadorenc** atinja o valor inteiro mais próximo de *n*.

$$n = \Delta\theta / 1.64$$

[2]

Caso ocorra algum erro na inserção dos valores dos ângulos inicial e final, pode-se zerar os valores previamente armazenados pressionando-se o botão 12.

Após o término do giro do fundo da câmara, o charriot é reposicionado, por meio do acionamento dos motores, para que a objetiva volte a focalizar, no centro da tela do computador, a célula de trabalho. Para isso, é necessário o conhecimento da posição final da célula após a rotação, que depende de dois ângulos: (1) do ângulo inicial formado entre a célula e o eixo x (β), obtido por meio do arco-tangente da posição da célula em y e x (Figura 16 - a), e (2) do ângulo de giro da célula desejado ($\Delta\theta$), o mesmo ângulo que gira o fundo da câmara e o eixo cartesiano xy para x'y' (Figura 16 - b). Desta forma, sendo r o raio formado entre o centro da célula e o centro da câmara, temos que, ao final da rotação, a célula está posicionada a um ângulo $\beta + \Delta\theta$ em relação ao eixo x. O reposicionamento do charriot dá-se pelo acionamento dos motores de passo até que **posicaoox** e **posicaooy** sejam iguais a $r\cos(\beta + \Delta\theta)$ e $r\sin(\beta + \Delta\theta)$, respectivamente (Figura 16 - c).

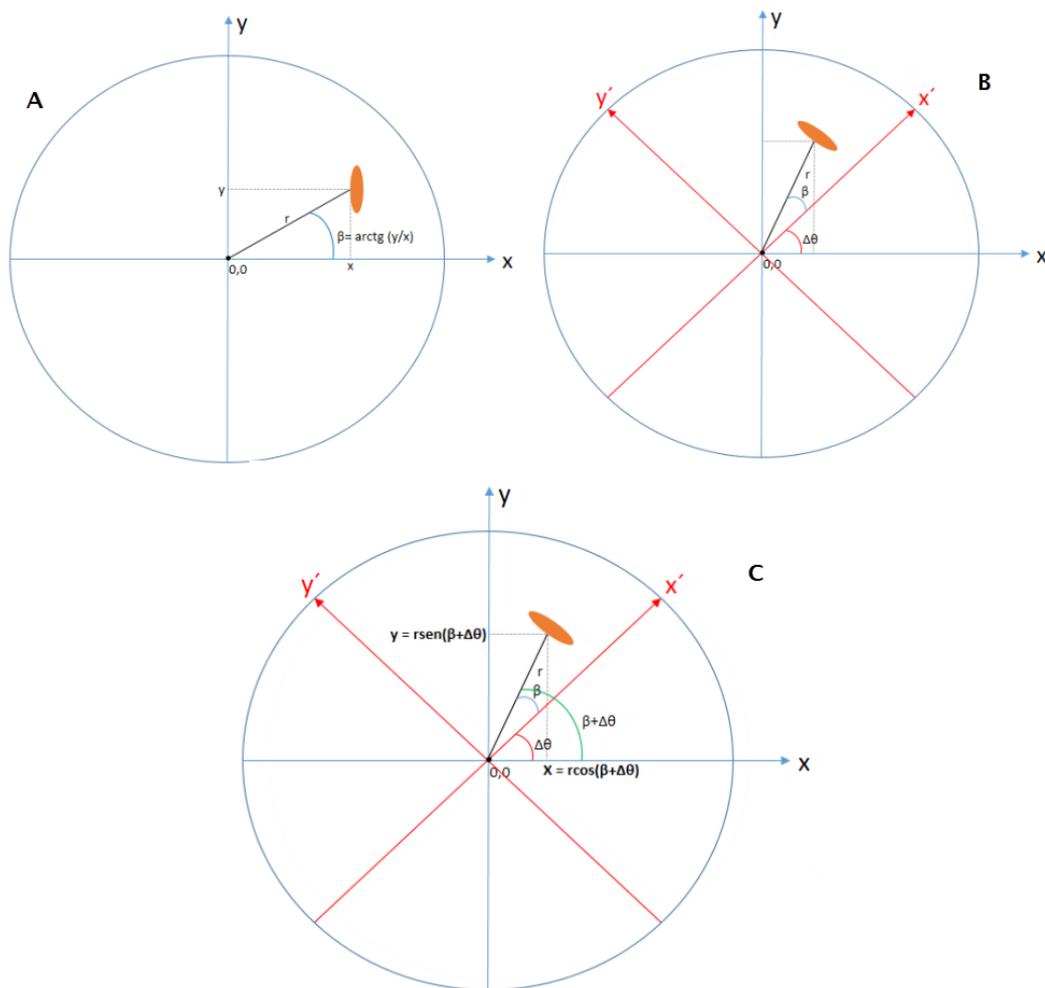


Figura 16. Representação do giro do fundo da câmara para ilustrar o reposicionamento do *charriot* do microscópio.

3.2.3. Estimulador elétrico de alta intensidade (EAI)

Foi utilizado um estimulador para induzir lesões nas células com pulsos monopares de alta intensidade (EAI, Fabricação CEB/ Unicamp, Figura 5 - G) que fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares); 0 - 135 V; 0,1 - 10 Hz; 0,1 - 50ms de duração; corrente máxima de 1,8A; com entrada para trigger externo.

3.2.4. Estimulador elétrico de baixa intensidade (EBI)

Para a aplicação de estímulos elétricos de baixa intensidade foi utilizado um estimulador com pulsos bipolares de baixa intensidade (EBI, Fabricação CEB/Unicamp, Figura 5 - F), que fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono

ou bipolares); 0 - 45 V; 0,1 - 10 Hz, 0,1 - 10 ms de duração; corrente máxima de 100 mA.

3.2.5. Comutador

O comutador utilizado (Figura 5 – H) consiste em uma chave de 2 pólos com 2 posições para a seleção do estimulador a ser utilizado.

3.2.6. Descarte

O descarte (Figura 5 – E) de solução e resíduos consiste em um recipiente de vidro conectado ao sistema de vácuo e à saída da câmara de estimulação/perfusão.

3.2.7. Osciloscópio

Para observação e medição dos pulsos de cada estimulador, foi utilizado um osciloscópio digital (modelo DSO-X-2014A, 100 MHz, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA, Figura 5 - I).

3.3. Protocolo experimental

Inicialmente, foi depositada no fundo da câmara de perfusão uma fina camada de colágeno, a fim de proporcionar a boa aderência das células. Após o tempo de secagem do colágeno, aproximadamente 20 minutos, as células foram depositadas na câmara e aguardou-se novamente um período de 20 minutos para que essas se fixassem à lamínula de vidro.

No início de cada experimento, focalizou-se, com uma objetiva de 10x o centro da câmara de perfusão que foi marcado com uma caneta nanquim na parte externa da lamínula de vidro. Neste ponto, o joystick foi pressionado e as variáveis correspondentes às posições atuais x e y foram zeradas (**posição 0,0**), de forma que no início dos experimentos a câmara estivesse centralizada com a objetiva. Deu-se início à perfusão com NT, com fluxo em regime laminar, a uma taxa de aproximadamente 3 ml/min. Concomitantemente, foi feita uma varredura pela câmara, movimentando-se o *charriot* por meio do *joystick*, em busca de uma célula em boas condições (com estrias claramente visíveis e respondendo a estímulos elétricos por meio de contração). Cinco posições de células puderam ser armazenadas e recuperadas quando desejado, de modo que foi possível escolher a célula nas melhores condições dentre as cinco boas candidatas numa mesma câmara de

maneira automática. Seleccionada uma célula para trabalho, esta célula teve seu eixo maior orientado a 0°, 30°, 60° ou 90° (grupos experimentais) em relação ao E, por meio da rotação do fundo da câmara. Uma foto da célula foi tirada, com a *webcam* do microscópio, e a orientação da célula com relação ao E foi confirmada com o uso do software de edição de imagens Adobe Photoshop (Adobe Systems), com o qual também foram realizadas as medidas de largura (2a) e comprimento (2c), de forma que, posteriormente, esses valores foram convertidos para dimensões reais levando em conta o aumento do sistema de microscopia.

3.3.1. Limiar de estimulação (E_T)

O passo seguinte foi a determinação do limiar de estimulação da célula escolhida, ou seja, a estimulação mínima capaz de evocar a contração do miócito. O estimulador de baixa intensidade foi ajustado para produzir estímulos bipolares de tensão elétrica com duração total de 10 ms (5 ms cada semi-ciclo) a 0,5 Hz. A tensão elétrica de saída foi diminuída gradativamente até que se observasse o limiar excitatório, considerado o menor valor de tensão que ainda evoca contração.

A partir deste valor de tensão, medido no osciloscópio, o E foi calculado por meio da equação 1.

Determinado o E_T , aumentou-se em 20% a tensão aplicada, a fim de garantir que a célula continuasse a realizar contrações em resposta aos estímulos de baixa intensidade, independentemente de pequenas flutuações do limiar.

3.3.2. Máxima variação do potencial transmembrana induzida pelo campo elétrico limiar (ΔV_T)

Para o cálculo da ΔV_T foi utilizado o modelo proposto por Klee & Plonsey (1976), o qual assume que o miócito cardíaco possui a geometria de um esferoide prolato (Bassani *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2008). Neste modelo, pode-se calcular a ΔV_T com base no E aplicado, na direção entre E e o eixo maior da célula e nas dimensões celulares, conforme a expressão 3.

$$\Delta V_T(E, \theta, a, c) = E * (a^2 A^2 \text{sen}^2 \theta + c^2 C^2 \text{cos}^2 \theta)^{\frac{1}{2}} \quad [3]$$

Nesta expressão temos que $a = \frac{\text{largura da célula}}{2}$ e $c = \frac{\text{comprimento da célula}}{2}$.

A e C são parâmetros dependentes apenas da geometria celular (**a** e **c**) e da excentricidade do esferoide (ϵ), como mostrado na expressão 4.

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

$$A = \left\{1 - 0,5 \epsilon^{-2} - \left[0,25(1 - \epsilon^2) \ln \frac{1-\epsilon}{1+\epsilon}\right] \epsilon^{-3}\right\}^{-1} \quad [4]$$

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

3.3.3. Determinação do E letal

Determinado o limiar de estimulação, o EAI foi ajustado para a aplicação de pulsos monopolares de tensão com duração de 5 ms de, inicialmente, 8 vezes o valor do limiar de estimulação. A aplicação do pulso de alta intensidade foi feita de forma síncrona, ou seja, no intervalo entre dois pulsos do EBI, a estimulação foi “chaveada”, por meio de um comutador, para o EAI e o pulso de alta intensidade foi aplicado no mesmo instante em que seria aplicado um pulso de baixa intensidade. Após a aplicação do pulso por meio do EAI, ambos os estimuladores foram desacoplados e um período de até 10 minutos foi aguardado para que a célula se recuperasse (voltasse a realizar contrações em resposta a um estímulo supralimiar). Em seguida, a estimulação com o EBI foi retomada e o EAI ajustado para um valor maior que o anterior. Este protocolo foi repetido para estímulos de alta intensidade de 12, 16, 20, 25 e 30 vezes o E_T ou até que a célula desenvolvesse contratura irreversível, o que foi considerado morte celular.

3.4. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados com o programa Prism 5.03 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

Três testes de normalidade - D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov - foram aplicados sobre $2a$, $2c$, E_T e ΔV_T de células orientadas a 0° , 30° , 60° e 90° . Um parâmetro foi considerado como tendo distribuição normal se passasse em ao menos 2 dos 3 testes. Em seguida, comparou-se as médias de cada grupo (0° , 30° , 60° e 90°), para cada parâmetro, utilizando-se análise de variância monofatorial seguido de pós teste de Bonferroni, sendo que $p < 0,05$ foi considerado indicativo de significância estatística. Os resultados obtidos estão apresentados como média acompanhada de erro-padrão da média.

A fim de se obter as curvas que relacionam o E com a probabilidade de letalidade (curvas de letalidade), os campos elétricos letais e sub-letais máximos foram analisados com a ferramenta de cálculo *survival test*, cuja tabela de saída foi tratada por um ajuste não linear por uma função sigmoide, descrita pela expressão 5, onde $P(E)$ é a probabilidade de letalidade associada ao E, E_{50} é o valor médio do E correspondente a 50% da letalidade e h é o coeficiente de hill.

$$P(E) = \frac{1}{1 + \left(\frac{E_{50}}{E}\right)^h} \quad [5]$$

Os dados resultantes do ajuste não linear estão apresentados como média acompanhada de intervalo de confiança para 99% (IC99). Neste caso, a não sobreposição do IC99 entre os grupos foi considerado indicativo de diferença estatística significativa.

4. Resultados

4.1. Instrumentação

4.1.1. Sistema de microscopia

De modo geral, o sistema desenvolvido foi de fácil manuseio e adequado para a realização de experimentos com células. Com ele foi possível a realização dos experimentos de forma facilitada e agilizada quando comparado com o método usual de experimentação com células (aquele em que a movimentação do *charriot* é manual e não há armazenamento ou recuperação de posições de células). Na Figura 17 pode-se visualizar uma foto do sistema com as adaptações que foram realizadas, incluindo o sistema de iluminação (Figura 17, A) na parte superior, a câmara de perfusão posicionada sobre o *charriot* que está acoplado aos motores de passo (Figura 17, B) e a caixa contendo os circuitos de controle e itens de interface com usuário (Figura 17, C). Uma foto de uma célula orientada a 60°, utilizada em um dos experimentos, pode ser vista na Figura 18. Quando utilizada a objetiva de 10x, o aumento obtido é de aproximadamente 200x e a resolução é de 1,25 $\mu\text{m}/\text{px}$.

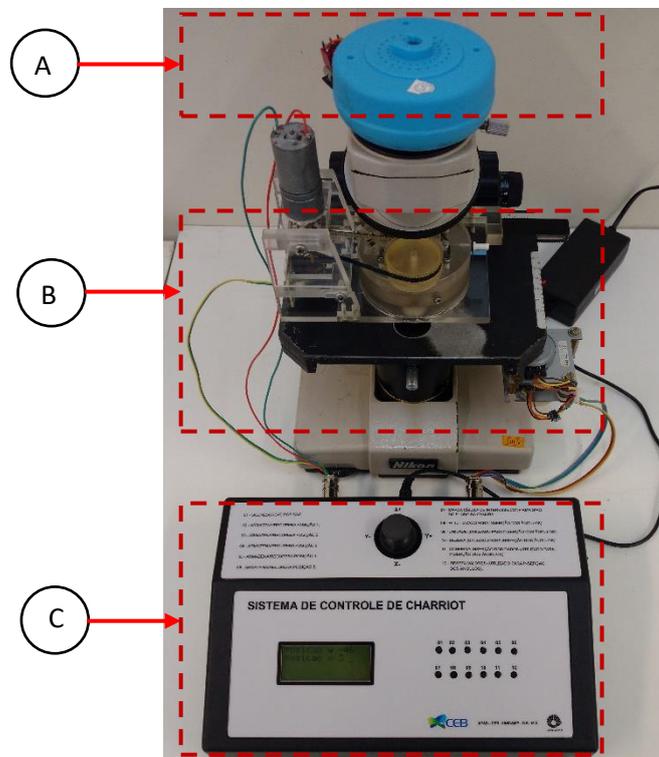


Figura 17. Sistema de microscopia adaptado. A) Iluminação superior; B) câmara de perfusão e motores de passo acoplados ao *charriot*; C) sistema de controle.

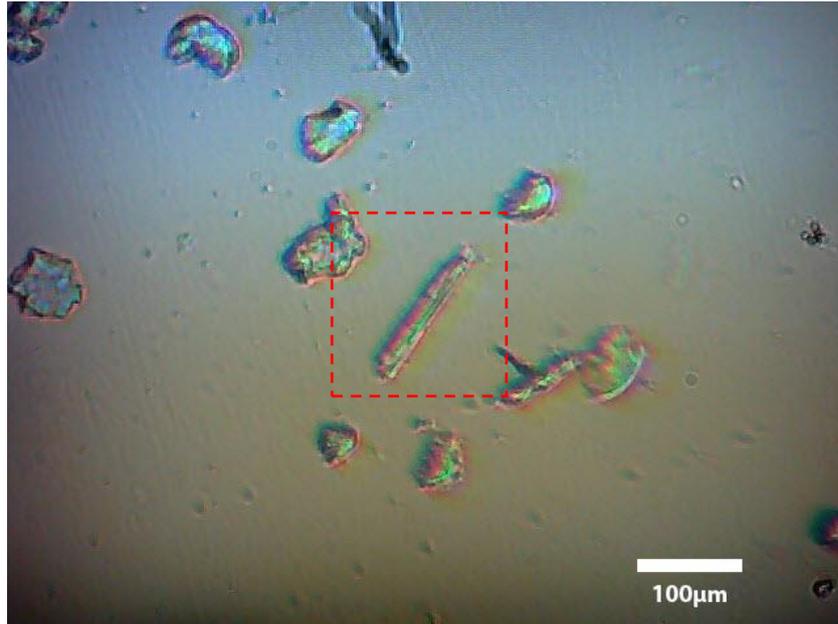


Figura 18. Célula orientada a 60° visualizada no sistema de microscopia com aumento aproximado de 200 vezes.

4.1.2. Movimentação motorizada do *charriot*

Na Figura 19 pode-se ver o acoplamento realizado entre o *charriot* e os motores de passo. A fixação dos motores foi feita por meio da utilização de parafusos e o acoplamento mecânico foi feito por uma correia dentada, que transfere o movimento do bloco de redução do motor de passo ao *knob* adaptado do *charriot*. Obteve-se, para o motor responsável pela movimentação do *charriot* no eixo x, um deslocamento de $5,5 \pm 0,025 \mu\text{m}$ por passo e, para o motor responsável pela movimentação em y, um deslocamento de $9,1 \pm 0,026 \mu\text{m}$ por passo (Figura 20). Tais deslocamentos foram diferentes para cada motor, pois as relações das engrenagens vinculadas aos eixos do *charriot* são diferentes. No entanto, observou-se, como esperado, um comportamento linear dos motores e uma variabilidade da distância em relação ao número de passos pequena (desvio padrão mal pode ser observado na Figura 20), o que foi importante para garantir a recuperação precisa de posições de miócitos.

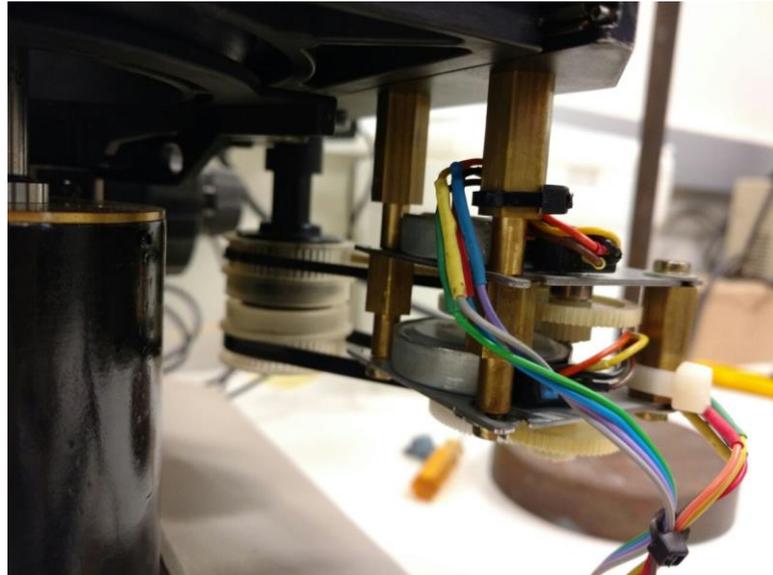


Figura 19. Foto com visão aproximada do acoplamento mecânico realizado entre os motores de passo e *charriot* do microscópio.

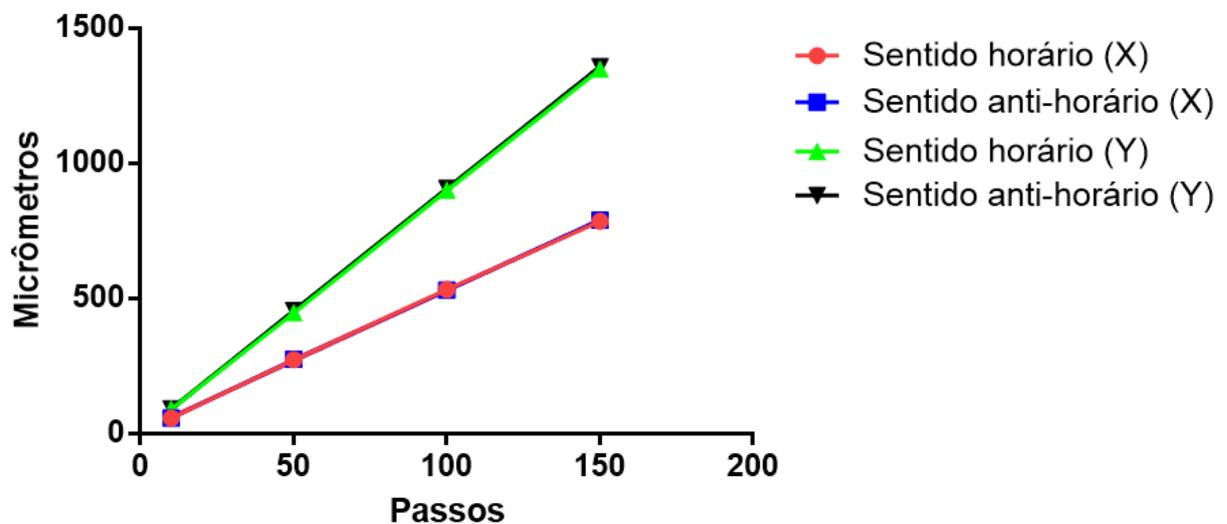


Figura 20. Teste de precisão do deslocamento dos motores de passo: Gráfico de média e desvio padrão da média para diferentes deslocamentos em μm em função do número de passos aplicado.

Observa-se na Figura 21 o circuito desenvolvido para o controle do *charriot* e do giro do fundo da câmara de perfusão (Figura 21 - A), junto com as placas de driver para controle dos motores de passo (Figura 20 - B), placa de driver para controle do Motor DC (Figura 21 - C), placa de alimentação de 12 V para os drivers dos motores (Figura 21 - D) e placa de alimentação de 5 V para o circuito principal (Figura 21 - E). Esses itens foram colocados no interior de uma caixa e os itens de interface com o

usuário foram posicionados de forma conveniente para operação pelo usuário, como é mostrado na foto da Figura 22, onde pode-se ver o joystick utilizado para movimentação do *charriot* em duas direções perpendiculares, x e y (Figura 22, A), o LCD utilizado para comunicação com usuário (Figura 22, B), botões utilizados para armazenamento e recuperação de posições (Figura 22, C) e botões utilizados para controle do giro do fundo da câmara de perfusão (Figura 22, D).

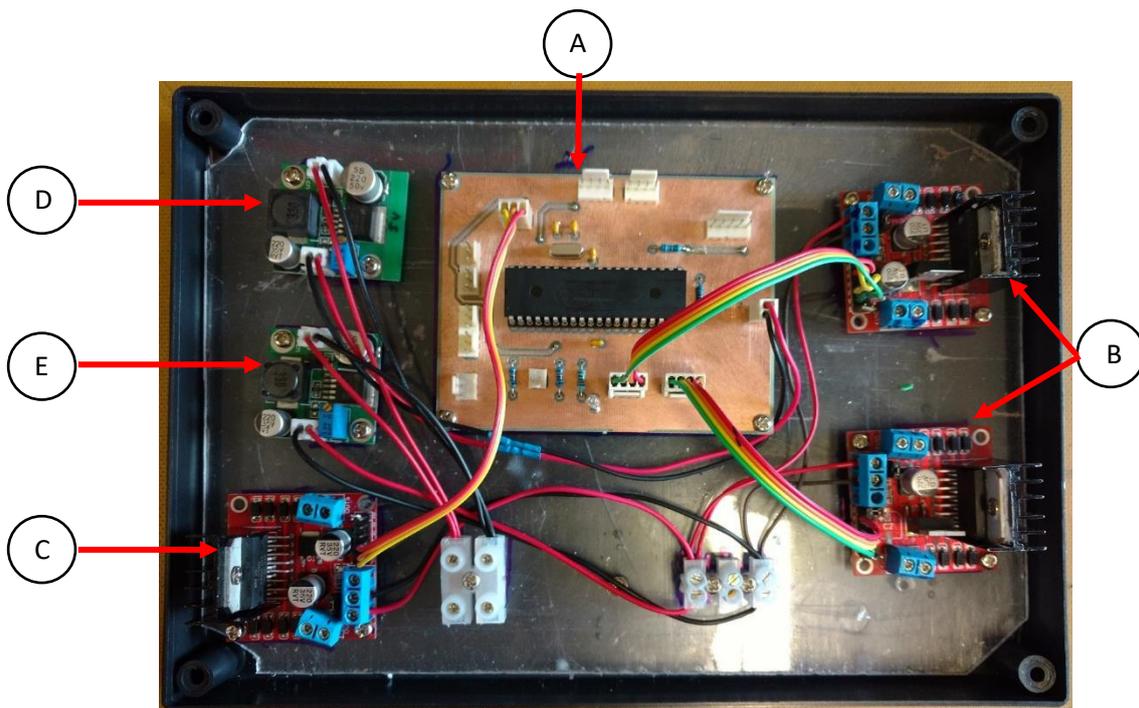


Figura 21. A) Placa com circuito principal; B) circuitos de driver para os motores de passo; C) circuito de driver para o motor DC; D) placa de alimentação para os drivers (12V); E) placa de alimentação de alimentação para o circuito principal (5V).

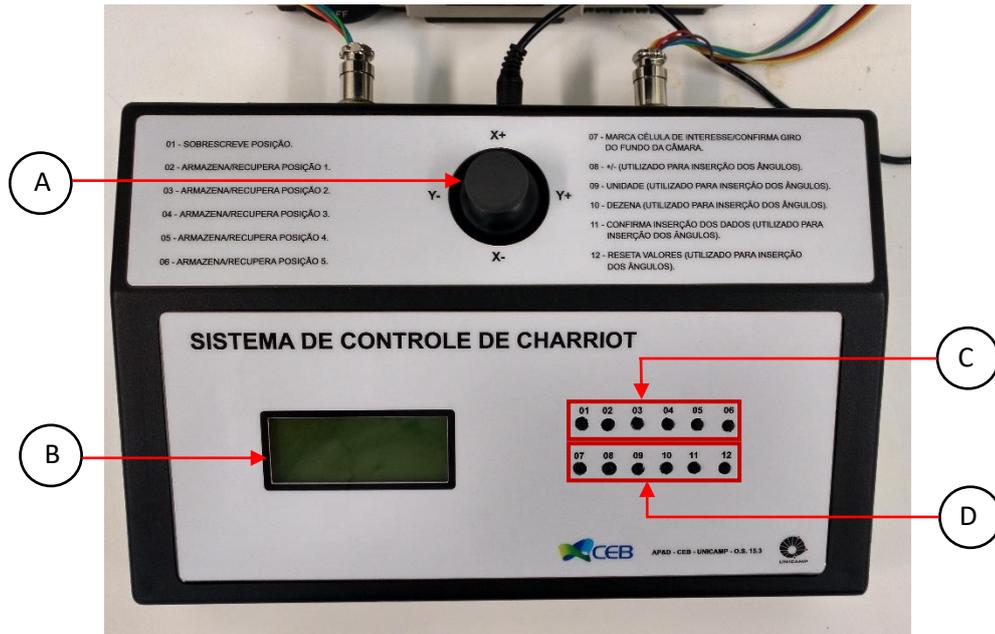


Figura 22. Sistema de controle para movimentação do *charriot* e do fundo da câmara de perfusão. A) Joystick para movimentação do *charriot* em duas direções; B) LCD para comunicação com usuário por via de mensagens; C) botões utilizados para armazenamento e recuperação de posições de miócitos; D) botões utilizados para controle do giro do fundo da câmara de perfusão.

4.1.3. Câmara de perfusão com fundo giratório

Na Figura 23 podem ser vistas fotos das vistas superior e inferior da câmara desmontada destacando-se suas partes principais, como a lamínula de vidro (Figura 23 – A, 1), o o-ring externo (Figura 23 – A, 2), o knob para giro manual da lamínula (Figura 23 – A, 3), eletrodos de platina para estimulação dos miócitos (Figura 23 – A, 4), conexão para entrada de solução de perfusão (Figura 23 – A, 5), conexão de saída a ser ligada em sistema de vácuo para recolhimento de solução (Figura 23 – A, 6), abertura para deposição dos miócitos (Figura 23 – A, 7), engrenagem menor que é conectada ao knob da parte superior por meio de um parafuso (Figura 23 – B, 8) e que transmite seu movimento a engrenagem maior (Figura 23 – B, 9), cuja parte superior está colada à lamínula de vidro. Uma foto da câmara após sua montagem é mostrada na Figura 24, onde pode-se ver a região formada pela superposição das partes superior e inferior da câmara, dando origem à região para a deposição de miócitos (Figura 24, A), com área total de 225 mm², porém, área útil de 50 mm², onde células podem ser rotacionadas. O knob localizado na parte superior da câmara pode ser acoplado por meio de uma correia a um módulo extra composto por motor DC e

sistema de posicionamento, como mostrado na Figura 25, para que o giro do fundo da câmara fosse realizado de forma automatizada e com precisão de giro $\pm 0,8^\circ$.

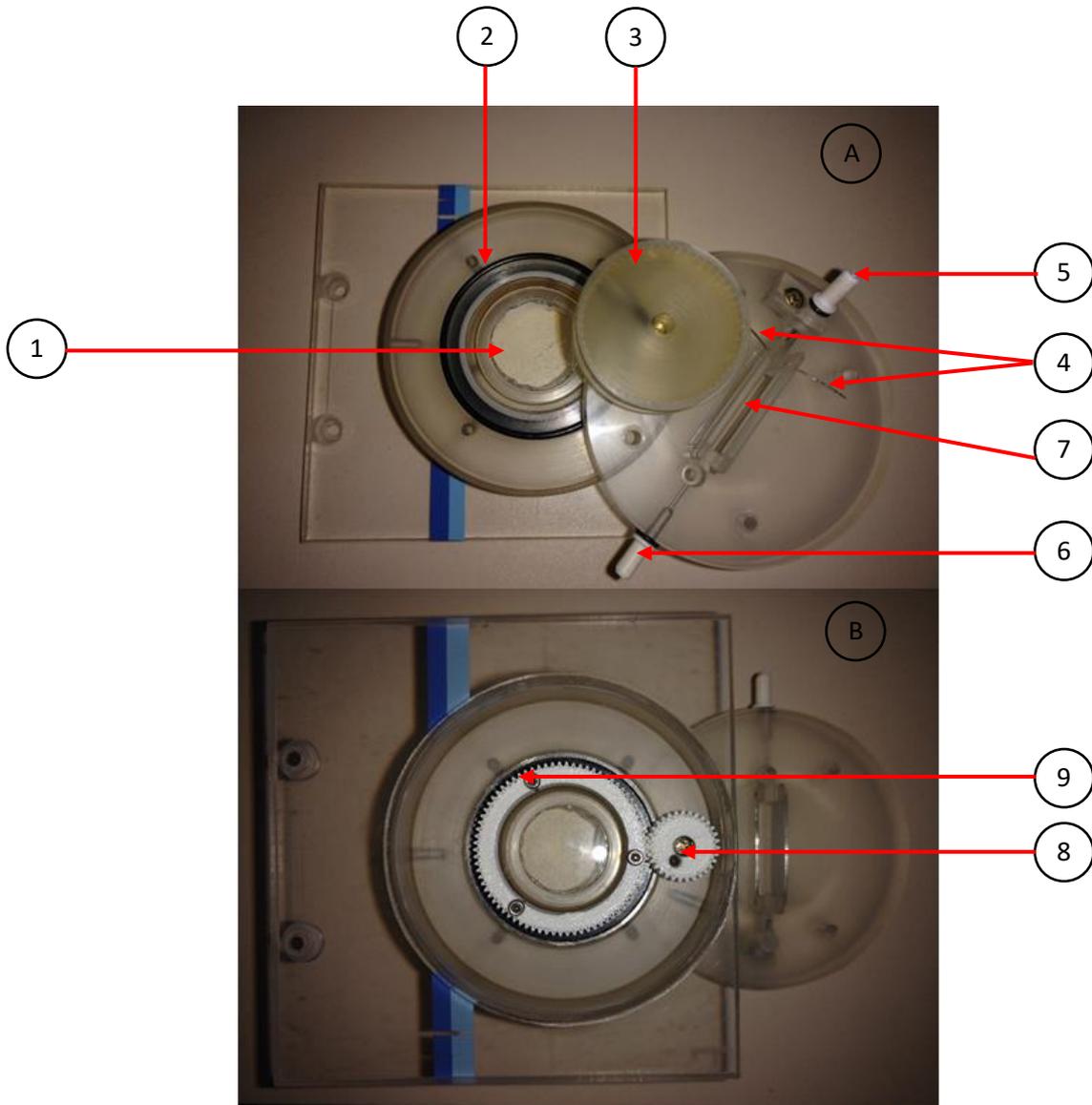


Figura 23. Fotos das vistas A) superior e B) inferior da câmara de perfusão desmontada e suas partes principais: 1) lamínula de vidro; 2) o´ring externo para vedação; 3) knob para o giro da lamínula; 4) eletrodos de estimulação; 5) conexão para entrada de solução; 6) conexão para saída de solução; 7) espaço para deposição de miócitos; 8) engrenagem menor conectada ao knob por meio de um parafuso; 9) engrenagem maior cuja parte superior está colada à lamínula de vidro.

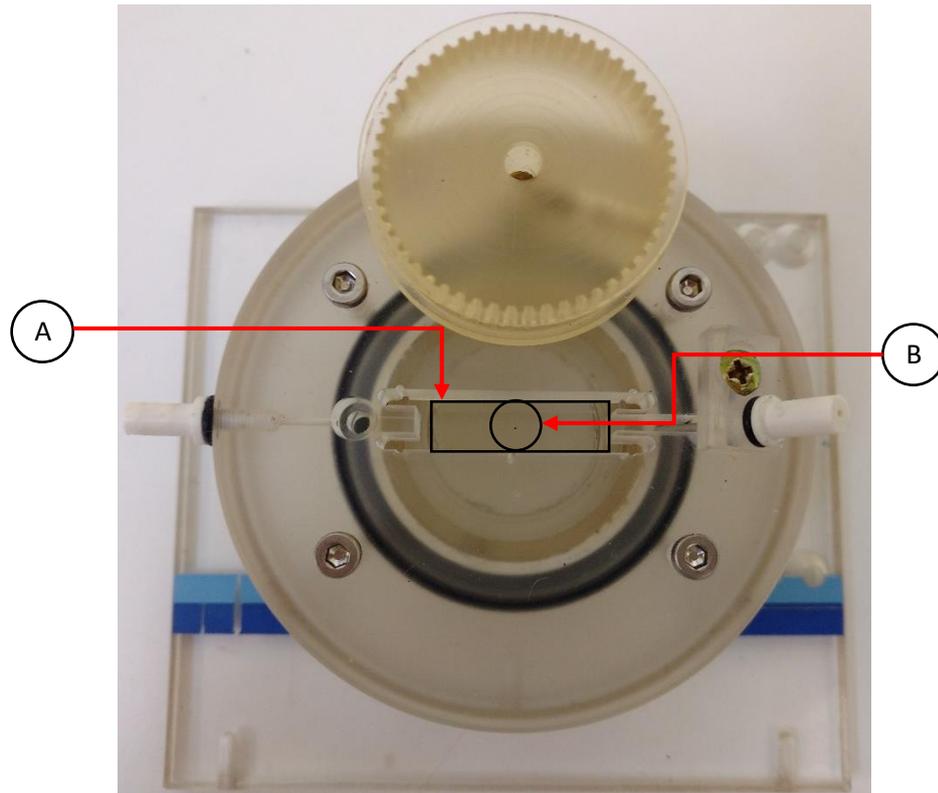


Figura 24. Foto da câmara de perfusão após sua montagem. A) Região total para deposição dos miócitos e B) região útil de trabalho onde as células podem ser rotacionadas sem saírem da área de perfusão e observação.

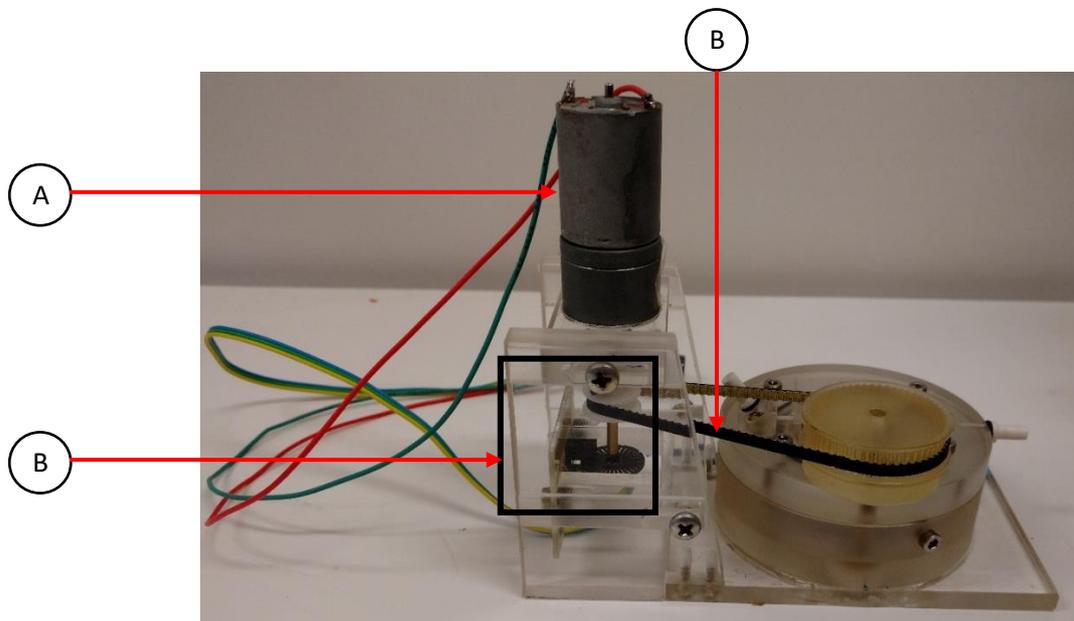


Figura 25. Câmara de perfusão acoplada ao sistema de posicionamento composto por A) motor DC; B) sistema de posicionamento; C) correia para transmissão do movimento gerado pelo motor DC ao knob da câmara de perfusão e consequente giro do seu fundo.

4.2. Resultados experimentais

Foram analisadas 26 células no grupo 0°, 29 no grupo 30°, 21 células no grupo 60°, 11 células no grupo 90° e os resultados mostrados a seguir foram obtidos destas populações de células.

As médias acompanhadas dos erros padrões dos parâmetros medidos durante os experimentos podem ser observados na Tabela 2. São mostrados o E_T para pulsos bipolares de duração total de 10ms (5ms cada fase), ΔV_T , $2c$ e $2a$ dos miócitos estudados. A única grandeza que mostrou dependência do ângulo de aplicação do E foi E_T ($p < 0,0001$), sendo estatisticamente diferente entre todos os grupos, exceto entre 0° e 30°.

Tabela 2. Média \pm erro padrão da média para E_T , ΔV_T , $2c$ e $2a$, para os grupos experimentais 0°, 30°, 60° e 90° ($n=26$, $n=29$, $n=21$, $n= 11$, respectivamente). # indica diferença estatística significativa ($p < 0,001$) de um grupo em relação a todos os outros grupos.

	0°	30°	60°	90°
E_T [V/cm]	$2,87 \pm 0,11$	$3,33 \pm 0,11$	$4,3 \pm 0,21^{\#}$	$6,34 \pm 0,24^{\#}$
ΔV_T [mV]	$20,19 \pm 0,87$	$23 \pm 0,75$	$21,2 \pm 1,03$	$20,77 \pm 1,11$
$2a$ [μm]	$134,7 \pm 3,73$	$145,5 \pm 3,75$	$143,3 \pm 3,16$	$132,4 \pm 5,11$
$2c$ [μm]	$32,8 \pm 1,62$	$37,2 \pm 1,67$	$38,7 \pm 2,05$	$35,8 \pm 2,58$

A Tabela 3 contém os valores médios e intervalos de confiança para 99% (IC99) dos E associados a 50% de probabilidade de letalidade (E50) e coeficiente de Hill que foram obtidos para os grupos experimentais 0°, 30°, 60° e 90° ($n=26$, $n=29$, $n=21$, e $n=11$ respectivamente). Em relação ao E50, observou-se diferença estatística significativa entre todos os grupos estudados, enquanto o coeficiente de Hill não foi estatisticamente diferente entre nenhum dos grupos.

Tabela 3. Valores médios e intervalos de confiança para 99% (IC99) dos campos elétricos com 50% de probabilidade de letalidade (E50) e do coeficiente de Hill (h) para as curvas de letalidade obtidos para os grupos experimentais 0°, 30°, 60° e 90°. * indica diferença estatística significativa com relação a todos os outros grupos.

	Grupo	Média	IC99
E50 [V/cm]	0°	80,47	78,86 – 82,08*
	30°	97,48	95,89 – 99,06*
	60°	111,1	109,00 – 113,3*
	90°	140,2	136,00 – 144,4*
h	0°	6,56	5,62 – 7,50
	30°	8,76	7,32 – 10,19
	60°	8,98	7,43 – 10,52
	90°	10,56	6,95 – 14,18

Na Figura 26 estão apresentadas as curvas de letalidade celular em função do E para os grupos experimentais. Os símbolos referem-se aos valores médios obtidos pela ferramenta *survival-test* e as linhas verticais indicam o desvio padrão da média.

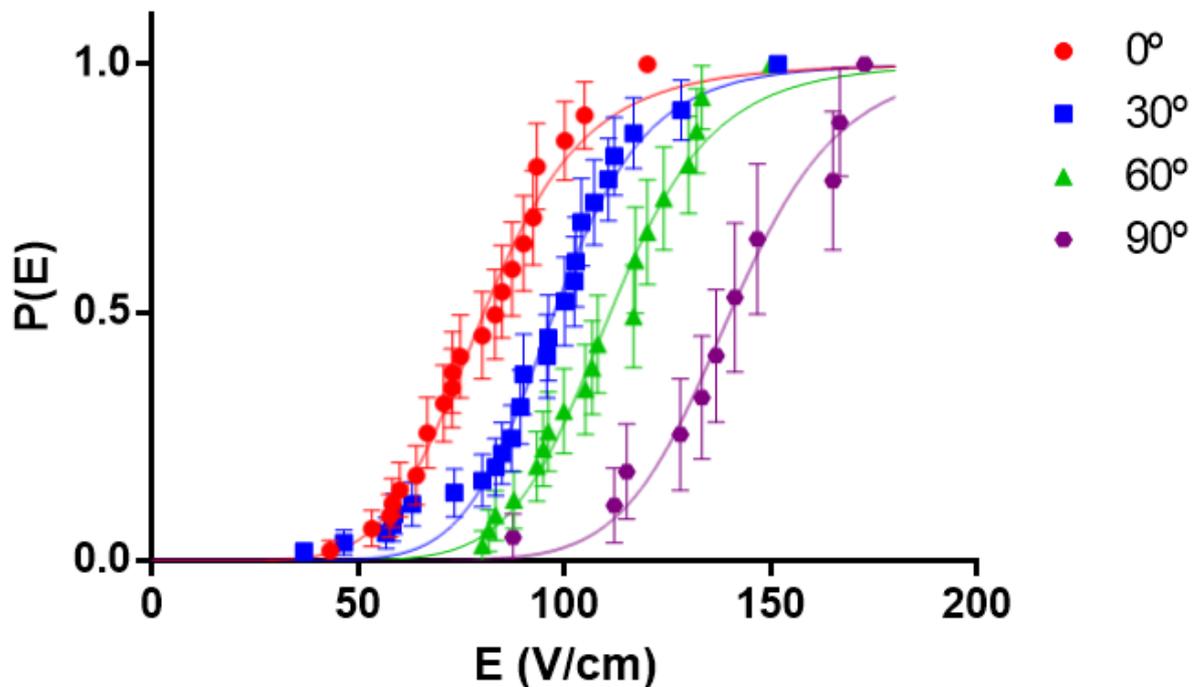


Figura 26. Curvas de probabilidade de letalidade de cardiomiócitos em função do campo elétrico (E) aplicado para os grupos 0° (N = 26), 30° (N = 29), 60° (N = 21) e 90° (N = 11).

Os valores de E foram convertidos em múltiplos do E_T . Pode-se perceber que os E50 entre todos os grupos se aproximaram (Figura 27), embora ainda possa ser observada diferença estatística significativa entre alguns grupos de células (IC99 não se sobrepõem, Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e intervalos de confiança para 99% (IC99) dos campos elétricos com 50% de probabilidade de letalidade (E50) e do coeficiente de Hill (h) das curvas de letalidade obtidos para os grupos experimentais 0°, 30°, 60° e 90°. O E foi expresso como um múltiplo do E_T ($x E_T$). * Indica diferença estatística significativa deste grupo com o grupo 0°. # Indica diferença estatística significativa deste grupo com o grupo 30°.

	Grupo	Média	IC99
E50 [$x E_T$]	0°	28,15	26,83 – 29,46
	30°	27,41	25,70 – 29,12
	60°	25,81	24,36 – 27,25
	90°	22,65	20,50 – 24,80*#
h	0°	5,62	4,30 – 6,94
	30°	9,58	4,48 – 14,68
	60°	11,42	4,53 – 18,32
	90°	8,52	2,73 – 14,31

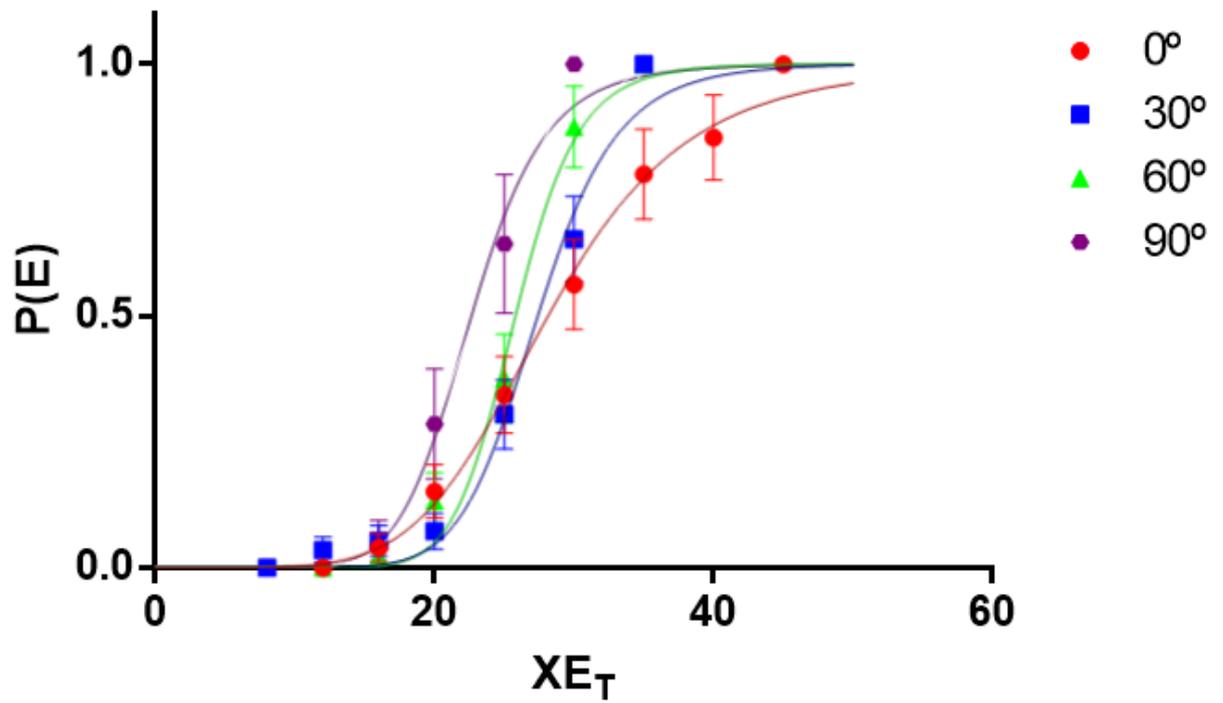


Figura 27. Curvas de probabilidade de letalidade em função do campo elétrico (E) aplicado para os grupos 0° ($N = 26$), 30° ($N = 29$), 60° ($N = 21$) e 90° ($N = 11$). Nestas curvas o E foi expresso como um múltiplo do E_T (xE_T). As linhas verticais indicam o desvio padrão da média.

5. Discussão e limitações

5.1. Sistema de microscopia com movimentação motorizada do *charriot*

O sistema de microscopia desenvolvido foi adequado para a realização de experimentos com cardiomiócitos. A modificação realizada no microscópio (de não invertido para invertido) possibilitou que a objetiva ficasse bem próxima da amostra de células e que um aumento satisfatório de cerca de 200x fosse obtido. Com tal aumento obtivemos imagens adequadas, o que foi suficiente para a observação e busca de células, medição de dimensões e análise das respostas a aplicação do E.

Com o circuito desenvolvido para movimentar o *charriot* do microscópio e com o uso de motores de passo e um *joystick*, a realização dos experimentos com células ficou mais eficiente, de modo que estes experimentos puderam ser realizados com maior precisão e rapidez quando comparado ao modo usual de operação de microscópio, isto é, modo em que a movimentação do *charriot* dá-se pelo giro manual dos knobs acoplados aos seus eixos, obtendo-se deslocamentos maiores e menos suaves do que aqueles proporcionados pelos motores de passo. Deste modo, o uso dos motores de passo garantiu deslocamentos precisos e tão curtos ou longos quanto o estipulado pelo software desenvolvido e pela limitação dos motores. Da mesma forma, o conhecimento da posição do *charriot* é útil para que o pesquisador possa selecionar algumas células que são adequadas para o experimento e realizá-lo, a princípio, com a melhor célula presente na câmara. Além disso, caso haja perda de uma célula durante o experimento, rapidamente, o pesquisador pode reencontrar uma outra célula que já havia sido marcada como adequada. No entanto, a mecânica do sistema carece de melhorias, a fim de que seja evitado um acúmulo de perda de passos por parte dos motores. Uma vez que os motores de passo utilizados foram obtidos de impressora antigas e desativadas e que as correias que transferem os movimentos dos motores para o *charriot* foram coladas manualmente, torna-se difícil obter um controle perfeito sobre o sistema.

5.2. Câmara de perfusão com fundo giratório

Com o desenvolvimento da câmara de perfusão com fundo giratório, cujo pedido de patente foi realizado, os experimentos com células puderam ser executados mais rapidamente e o desperdício de material foi minimizado, pois, desde que existisse na área útil da câmara uma célula apropriada (tamanho adequado, presença

de estrias e respondendo adequadamente aos estímulos aplicados), era garantido o posicionamento da célula em relação ao E, de acordo com a necessidade do pesquisador. Essa funcionalidade foi aprimorada por meio da conexão da câmara a um motor DC, agilizando a realização dos experimentos, por meio do posicionamento preciso proporcionado pelo *encoder*, e reduzindo a imprecisão mecânica que ocorria quando se girava o knob manualmente. Com o motor DC o giro do fundo da câmara foi mais suave e controlado do que aquele fornecido pelo método manual.

O reposicionamento do *charriot* após o giro do fundo da câmara, possibilitando reexibir a célula de trabalho após a sua rotação de forma automatizada, foi eficiente somente até um certo ponto. Apesar do cálculo teórico adequado, em alguns casos, fatores como a instabilidade mecânica do sistema (perda de passos dos motores), falta de precisão na marcação do centro da câmara (feita manualmente com caneta nanquim) e na marcação da posição da célula de trabalho (a célula a ser girada deve estar precisamente centralizada com a objetiva, por conseguinte, no centro da tela do computador), contribuíram como fontes de erros, criando a necessidade de uma correção manual para reposicionar a célula de trabalho no campo de visão, para alguns casos. Uma vez que o erro de reposicionamento observado não foi constante, não foi factível realizar uma compensação por software, porém, foi possível verificar que para células próximas o suficiente do centro da câmara (células posicionadas a uma distância de até 1155 μm em x e até 1911 μm em y) a recuperação ocorre de forma satisfatória, pois a célula, após a rotação, encontra-se novamente dentro do campo de visão.

O custo aproximado do protótipo, incluindo 2 motores de passo, 1 motor DC de 12 V com redução, 3 drivers, engrenagens, correias, material para construção da câmara de perfusão, componentes para montagem do circuito de controle e caixa para armazenamento do circuito, foi de R\$600,00.

5.3. Resultados experimentais

5.3.1. Máxima variação do potencial transmembrana no limiar, largura e comprimento

Os valores de ΔV_T , $2a$ e $2c$, mostrados na Tabela 2, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais, o que é importante para garantir homogeneidade das amostras de células utilizadas, uma vez que dimensões celulares diferentes podem influenciar o E_T e o E letal (Goulart *et al.*, 2012). A ΔV_T média

encontrada foi de aproximadamente 20 mV, independente da direção do E aplicado, e está de acordo com valores já relatados na literatura para excitação de miócitos ventriculares de ratos (Bassani *et al.*, 2006; Goulart, 2012; Oliveira, 2008; Oshiyama, 2014). Valores médios de largura celular também foram semelhantes aos já encontrados (aproximadamente 35 μm), porém os valores médios dos comprimentos celulares foram cerca de 10% maiores (aproximadamente 140 μm) do que aqueles relatados (Prado *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2013; Goulart *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2008).

5.3.2. Campo elétrico limiar

Os valores obtidos de E_T em células orientadas a 0° (aproximadamente 2,87 V/cm) foram menores do que a maioria dos resultados encontrados na literatura (Oliveira *et al.*, 2008, $E_T = 3,2$ V/cm; Fonseca *et al.*, 2013, $E_T = 3,1$ V/cm; Prado *et al.*, 2016, $E_T = 3,33$ V/cm), o que pode ser explicado pelo fato de as células utilizadas neste trabalho possuírem comprimentos maiores (Goulart *et al.*, 2012), visto que a redução de cerca de 10% observada em E_T foi proporcional ao aumento observado no comprimento celular, conforme previsto pelo modelo de Klee & Plonsey (1976). Para células orientadas a 30° e 60° , os valores médios de E_T foram maiores que valores relatados previamente (Bassani *et al.*, 2006, $E_T (30^\circ) = 2,35$ e $E_T (60^\circ) = 3,08$ V/cm). Tal diferença pode ser devido às próprias amostras de células, ao fato de terem sido utilizados instrumentações diferentes (câmara de estimulação, ausência de perfusão) e diferentes procedimentos de isolamento dos miócitos ventriculares (por exemplo, concentrações diferentes de enzimas). E_T médio para o grupo 90° (6,34 V/cm) encontra-se em um intervalo de valores já relatados (Bassani *et al.*, 2006, $E_T = 4,6$; Oliveira *et al.*, 2008, $E_T = 7,2$ V/cm.), estando de acordo com o esperado, uma vez que o valor de $2a$ foi próximo ao encontrado na literatura e por manter uma relação de cerca de 2 vezes o E_T de células orientadas longitudinalmente (Oliveira, 2008).

Os valores de E_T observados na Tabela 2 são um indicativo de que há influência da direção de aplicação do E sobre o E_T ($p < 0,0001$). Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os grupos 0° e 30° , percebe-se uma tendência de aumento de E_T , como previsto (Klee & Plonsey, 1976) e reportado experimentalmente (Bassani *et al.*, 2006). Entre células orientadas a 0° e a 60° , verificou-se que essas orientadas a 60° necessitam de um E maior para serem estimuladas quando comparadas àquelas a 0° . Também foi observada a necessidade

de um E maior para células a 60°, quando comparadas com células orientadas a 30°. O grupo 90° contém as células que necessitam de um maior E, quando comparado a qualquer outra orientação, para que sejam estimuladas. Estes resultados estão de acordo com os observados na literatura (Klee & Plonsey, 1976; Bassani *et al.*, 2006; Oliveira, 2008). A diferença observada entre os valores de E_T para diferentes direções de aplicação do E deve-se ao fato de que a ΔV_m induzida por um E externo é dependente da geometria celular e da direção de aplicação do E (Klee & Plonsey, 1976; Tung *et al.*, 1991; Knisley *et al.*, 1993). A ΔV_m é mínima quando o E está aplicado transversalmente em relação ao eixo maior celular, fazendo com que um E maior seja necessário para atingir uma dada ΔV_T , e aumenta gradualmente à medida que a direção de aplicação do E se torna paralelo ao eixo maior celular. Desta forma, quanto menor o ângulo formado entre a direção de aplicação do E e o eixo maior da célula, menor será o E necessário para obter aquela mesma ΔV_T .

5.3.3. Curvas de letalidade

E50 médio para o grupo 0° foi de 80,82 V/cm, estando próximo aos valores já reportados na literatura (Oliveira *et al.*, 2008, E50 = 67,6V/cm; Goulart *et al.*, 2012, E50 = 68/cm; Prado *et al.*, 2016, E50 = 90,73 V/cm). Da mesma forma, o valor de E50 para o grupo 90° (140,7 V/cm) também está bem próximo ao que já foi relatado até o momento (Oliveira *et al.*, 2008, E50 = 136,6 V/cm). Observou-se novamente a relação de cerca de 2 vezes entre o E50 para células na transversal quando comparado com células na longitudinal (Oliveira *et al.*, 2008).

A não sobreposição dos IC99 para os 4 grupos estudados indica que há dependência da probabilidade de letalidade com a orientação da célula em relação à direção de aplicação do E.

Ocorre um aumento do E50, conforme se aumenta o ângulo entre o eixo maior da célula e o E aplicado (Tabela 3), mostrando um comportamento similar ao encontrado para E_T , como pode ser visualizado no gráfico da Figura 28, onde são mostradas as curvas referentes aos valores de E_T e E50 para diferentes ângulos entre o eixo maior da célula e a direção de aplicação do E. Assim, dada uma mesma probabilidade de letalidade, temos que células cujo eixo maior está orientado paralelamente ao E (0°) possuem maior sensibilidade ao E do que aquelas orientadas a 30°. Da mesma forma, células a 30° são mais sensíveis ao E se comparadas às aquelas orientadas a 60°. Já havia sido mostrado que células orientadas a 90° eram menos

sensíveis ao E (o E necessário para causar efeito letal é maior) do que células orientadas a 0° (Oliveira *et al.*, 2008), o que foi novamente observado neste trabalho, porém, não havia sido mostrado ainda curvas de probabilidade de letalidade e os E letais para células orientadas a 30° e 60° .

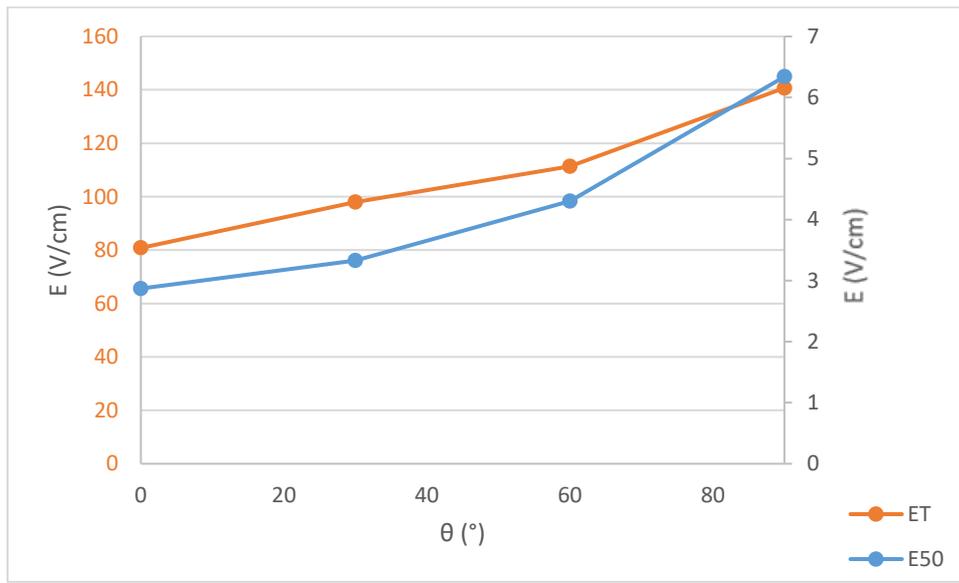


Figura 28. Gráfico comparativo do crescimento do ET e do E letal conforme se aumenta o ângulo entre a orientação celular e a direção de aplicação do campo elétrico.

Acredita-se que os E sejam letais às células devido ao fenômeno de eletroporação da membrana, que depende de V_m ultrapassar um certo valor limiar e cuja máxima variação deste potencial (ΔV_m) é dependente da intensidade do E aplicado, da geometria celular (2a e 2c) e do ângulo entre o eixo maior da célula e o E (θ). Assim, assumindo que a membrana é um dielétrico perfeito, uma possível explicação para o aumento gradual dos valores de E50 observados para orientações da célula entre 0° e 90° , pode ser obtida por meio do cálculo da ΔV_m induzida por um E de alta intensidade em uma célula com dimensões médias (comprimento igual a $130 \mu\text{m}$ e largura igual a $30 \mu\text{m}$) em diferentes orientações. Um E aplicado em uma célula orientada a 30° causa uma despolarização equivalente a 89% daquela causada a uma célula orientada a 0° (Klee & Plonsey, 1976). Já para uma célula orientada a 60° a despolarização causada é equivalente a 63% daquela sofrida por uma célula a 0° para um mesmo E. Esta despolarização é ainda menor se a célula estiver orientada transversalmente em relação ao E, sendo da ordem de 45%. Desta forma, podemos

assumir que à medida que aumentamos o ângulo entre o eixo maior da célula e a direção do E aplicado, a despolarização causada na membrana para um mesmo E aplicado diminui, o que reduziria a probabilidade de abertura de poros na membrana e, conseqüentemente, a probabilidade de letalidade. Porém, a membrana não é um dielétrico perfeito. Assim, esses valores percentuais encontrados acima não estão 100% corretos, estando superestimados, visto que o modelo proposto por Klee & Plonsey (1976), utilizado primariamente para descrever a excitabilidade celular, não leva em conta a abertura de poros na membrana, porém, nos permite verificar, qualitativamente, a necessidade de um aumento do E externo com o aumento do ângulo de orientação da célula para se atingir uma dada variação no potencial transmembrana capaz de causar a eletroporação (e, conseqüentemente, a morte celular).

Por mais que os processos de excitabilidade celular e de eletroporação da membrana celular sejam considerados fenômenos diferentes, visto que o primeiro é um processo auto estimulante, onde a abertura de um pequeno número de canais de sódio tensão dependentes aumenta a despolarização da membrana e, conseqüentemente aumenta a probabilidade de abertura de mais canais, levando ao disparo do PA (Silverthorn, 2010), e o segundo é um fenômeno auto limitante, onde o aumento da condutância da membrana, causada pela abertura de poros, limita a variação do potencial transmembrana (Cheek & Fast, 2004; Neunlist & Tung, 1997), ao expressarmos os valores de E letal como múltiplos de E_T (tabela 4), nós verificamos que o E_{50} para os grupos se aproximam, embora ainda seja observada diferença estatística significativa entre o grupo 90° com os grupos 0° e 30° . No entanto, essa diferença foi inferior a 20%, sendo muito menor que aquela observada para os valores absolutos de E_{50} (diferença de aproximadamente 75%). Ou seja, a normalização por E_T aproximou as curvas de letalidade, mas não foi suficiente para igualá-las. Esta diferença pode ser observada na Figura 28, por meio do aumento da diferença das taxas de crescimento entre E_T e E_{50} à medida que o ângulo se aproxima de 90° . Uma possível explicação para uma maior variação na taxa de crescimento do E_{50} deve-se ao fato de que, para células orientadas a 90° , a área da membrana exposta à máxima ΔV_m é maior quando comparada a células orientadas a 0° . (Oliveira *et al.*, 2008). Assim, apesar de a normalização por E_T não ser a ideal, ela nos mostra que ambos os processos mantêm uma estreita relação entre si, à medida que o ângulo entre o eixo maior celular e E aumenta. Este tipo de análise é útil para comparar resultados

cujas amplitude e direção de aplicação do E não podem ser determinados e nos permitiu inferir que um E de cerca de 26 vezes E_T corresponde a uma probabilidade de letalidade de pelo menos 50% das células.

Algumas limitações devem ser levadas em conta neste trabalho. Primeiramente, devemos considerar o aumento progressivo dos E de alta intensidade aplicados durante o protocolo experimental, uma vez que estes eram função do E_T . Da forma como o protocolo foi realizado, uma célula foi submetida a diversos choques antes de morrer, o que ativa mecanismos de reparo celular, reduzindo a vulnerabilidade da célula aos choques subsequentes (Steinhardt *et al.*, 1994; Togo *et al.*, 1999; Spaeth *et al.*, 2010). Também foi possível perceber, durante os experimentos, que alguns choques sub-letais e alta intensidade causavam danos às células, causando hipercontratura reversível e redução do seu comprimento. A redução do comprimento celular provoca o aumento do E50 (Goulart *et al.*, 2012) e, assim, o efeito cumulativo dos choques não deve ser ignorado, de modo que os valores de E letal apresentados neste trabalho podem estar superestimados. Mais estudos são necessários para se entender a influência do número de choques na letalidade celular.

Também devemos enfatizar que os experimentos foram realizados com células isoladas cujos eixos maiores estavam orientados a 0° , 30° , 60° ou 90° com relação ao E. É muito difícil extrapolar diretamente os resultados aqui obtidos para aplicações clínicas, visto que o coração possui diversas células de diferentes tamanhos, orientadas nas mais diversas direções e conectadas através de *gap-junctions*, criando regiões anisotrópicas no tecido cardíaco e uma distribuição heterogênea do E que é aplicado sobre ele, de forma que células em diferentes regiões do coração são expostas a diferentes amplitudes de E e variações no potencial transmembrana. Já foi mostrado que essas diferenças dependem não somente da localização da célula no coração, da orientação da célula com relação ao E e da geometria celular, mas também se deve à formação de eletrodos virtuais no tecido cardíaco - geração de catodos e anodos virtuais devido a heterogeneidades na estrutura do tecido cardíaco, gerando regiões localizadas de despolarização (Knisley, 1994; Roth, 1995; Ripplinger & Efimov, 2009).

6. Conclusão

Neste projeto foi desenvolvido um sistema de controle de *charriot* de microscópio com a utilização de motores de passo e um sistema de controle, facilitando e tornando mais rápida e precisa a realização de experimentos com células. Também foi possível, graças ao sistema de posicionamento, armazenar e recuperar posições de células, o que garantiu que fosse utilizada sempre a melhor célula presente na câmara a cada experimento realizado, já que não se corria mais o risco de perder sua posição ao buscar outras células pela câmara. Além disso, foi projetada e construída uma câmara de perfusão com fundo giratório, onde células isoladas eram rotacionadas no interior da câmara durante a realização de perfusão e estimulação sob E uniforme. O uso da câmara de perfusão com fundo giratório auxiliou no aumento do número de células analisadas, em menor tempo, para a obtenção dos resultados experimentais do projeto, uma vez que em todas as preparações foi possível encontrar ou posicionar pelo menos uma célula em um dos grupos experimentais.

Com a utilização da instrumentação desenvolvida, foi possível construir as curvas de letalidade para células orientadas a 0° , 30° , 60° e 90° . Com os resultados obtidos mostrou-se que a relação entre a orientação celular e a letalidade pode ser descrita como crescente e gradual, à medida que se aumenta o ângulo entre a direção da célula e a direção de aplicação do E. Estes dados eram ausentes na literatura e podem ser importantes como base para futuros protocolos de desfibrilação multidirecional (Viana, 2016).

7.Referências

- ABIDOR, I. G. et al. Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, v. 104, p. 37-52, 1979.
- AIDLEY, D. J.; ASHLEY, D. J. *The physiology of excitable cells*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- AVITALL, B. et al. Automatic implantable cardioverter/defibrillator discharges and acute myocardial injury. *Circulation*, v. 81, n. 5, p. 1482-1487, 1990.
- BABBS, C. F. et al. Therapeutic indices for transchest defibrillator shocks: effective, damaging, and lethal electrical doses. *American heart journal*, v. 99, n. 6, p. 734-738, 1980.
- BARDOU, A. L. et al. Directional variability of stimulation threshold measurements in isolated guinea pig cardiomyocytes: relationship with orthogonal sequential defibrillating pulses. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, v. 13, n. 12, p. 1590-1595, 1990.
- BASSANI, R. A. et al. Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes. *Physiological measurement*, v. 27, n. 9, p. 851, 2006.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 135, n. 10, p. e146-e603, 2017.
- BERS, D. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. Springer Science & Business Media, 2001.
- CHEEK, E.; FAST, V. Nonlinear changes of transmembrane potential during electrical shocks. *Circulation research*, v. 94, n. 2, p. 208-214, 2004.
- CHENG, D. K.; TUNG, Leslie; SOBIE, Eric A. Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 277, n. 1, p. H351-H362, 1999.
- CROCINI, C. et al. Optogenetics design of mechanistically-based stimulation patterns for cardiac defibrillation. *Scientific reports*, v. 6, 2016.
- DAHL, C. F. et al. Myocardial necrosis from direct current countershock. *Circulation*, v. 50, n. 5, p. 956-961, 1974.
- DAVIS, J. S. et al. Cardiac damage due to electric current and energy. In: *Proceedings of the Cardiac Defibrillation Conference*. Purdue University, West Lafayette, Ind, 1975. p. 27-32.

- DIMOVA, R. et al. A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 18, n. 28, p. S1151, 2006.
- DOSDALL, D. J.; FAST, V. G.; IDEKER, R. E. Mechanisms of defibrillation. *Annual review of biomedical engineering*, v. 12, p. 233-258, 2010.
- FEDOROV, V. V.; NIKOLSKI, V. P.; EFIMOV, I. R. Effect of electroporation on cardiac electrophysiology. *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*, p. 433-448, 2008.
- FONSECA, A. V.S. et al. Greater cardiac cell excitation efficiency with rapidly switching multidirectional electrical stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 60, n. 1, p. 28-34, 2013.
- GLASER, R. W. et al. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 940, n. 2, p. 275-287, 1988.
- GOMES, P. A. P. Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: medição de $[Ca^{2+}]$ e limiar de estimulação. Tese de doutorado. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 1997.
- GOMES, P. A. P.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. *IEEE transactions on biomedical engineering*, v. 48, n. 6, p. 630-636, 2001.
- GOÑI, F. M. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1838, n. 6, p. 1467-1476, 2014.
- GOULART, J. T. et al. The influence of cell dimensions on the vulnerability of ventricular myocytes to lethal injury by high-intensity electrical fields. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 28, n. 4, p. 337-345, 2012.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier Brasil, 2006.
- IVORRA, A. Tissue electroporation as a bioelectric phenomenon: Basic concepts. In: *Irreversible electroporation*. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 23-61.
- JONES, J. L. et al. Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 235, n. 2, p. H214-H222, 1978.
- KANDALA, J.; OOMMEN, C.; KERN, K. B. Sudden cardiac death. *British Medical Bulletin*, v. 122, n. 1, p. 5-15, 2017.
- KENNY, T. *The nuts and bolts of implantable device therapy: pacemakers*. John Wiley & Sons, 2014.

KERN, K. B. Postresuscitation myocardial dysfunction. *Cardiology clinics*, v. 20, n. 1, p. 89-101, 2002.

KINOSITA, K. et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. *Biophysical journal*, v. 53, n. 6, p. 1015-1019, 1988.

KLAUKE, N.; SMITH, G.; COOPER, J. M. Regional electroporation of single cardiac myocytes in a focused electric field. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 2, p. 585-592, 2009.

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

KNISLEY, S. B. et al. Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. *Circulation research*, v. 72, n. 2, p. 255-270, 1993.

KNISLEY, S. B.; HILL, B. C.; IDEKER, R. E. Virtual electrode effects in myocardial fibers. *Biophysical Journal*, v. 66, n. 3, p. 719-728, 1994.

KNISLEY, S. B.; GRANT, A. O. Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 27, n. 5, p. 1111-1122, 1995.

KOEPPE, B. M.; STANTON, B. A. *Berne & Levy Physiology*. Elsevier Health Sciences, 2009.

KONING, G.; VEEFKIND, A. H.; SCHNEIDER, H. Cardiac damage caused by direct application of defibrillator shocks to isolated Langendorffperfused rabbit heart. *American heart journal*, v. 100, n. 4, p. 473-482, 1980.

KOTNIK, T.; PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D. The cell in the electric field. In: *Clinical Aspects of Electroporation*. Springer New York, 2011. p. 19-29.

KOTNIK, T. et al. Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, v. 28, n. 5, p. 14-23, 2012.

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.

LEWIS, T. J. A model for bilayer membrane electroporation based on resultant electromechanical stress. *IEEE transactions on dielectrics and electrical insulation*, v. 10, n. 5, p. 769-777, 2003.

LOWN, B.; AMARASINGHAM, R.; NEUMAN, J. New method for terminating cardiac arrhythmias: use of synchronized capacitor discharge. *JAMA*, v. 256, n. 5, p. 621-627, 1986.

NEUMANN, E. et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, v. 1, n. 7, p. 841, 1982.

NEUNLIST, M.; TUNG, L. Dose-dependent reduction of cardiac transmembrane potential by high-intensity electrical shocks. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 273, n. 6, p. H2817-H2825, 1997.

- NIKOLSKI, V. P.; EFIMOV, I. R. Electroporation of the heart. *Europace*, v. 7, n. s2, p. S146-S154, 2005.
- NISHIZAKI, M. Life-threatening arrhythmias leading to syncope in patients with vasospastic angina. *Journal of Arrhythmia*, 2017.
- OLIVEIRA, P. X. Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato. Tese de mestrado. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2004.
- 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, 2008.
- OPIE, L. H. (Ed.). *Heart physiology: from cell to circulation*. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- OSHIYAMA, Natália Ferreira et al. Modelo matemático de potencial de ação e transporte de Ca²⁺ em miócitos ventriculares de ratos neonatos. Tese de doutorado. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2014.
- PARK, K. et al. Functional changes of the myocardium in survivors of high-voltage electrical injury. *Critical Care*, v. 17, n. 1, p. R26, 2013.
- PENNA, L. B.; BASSANI, R. A. Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats. *Stress*, v. 13, n. 1, p. 73-82, 2010.
- PRADO, L. N. et al. Ventricular myocyte injury by high-intensity electric field: Effect of pulse duration. *General physiology and biophysics*, v. 35, n. 2, p. 121-130, 2016.
- PUCIHAR, G. et al. The Pulse Intensity-duration dependency for Cell Membrane Electroporation. 2010.
- QU, Z. Critical mass hypothesis revisited: role of dynamical wave stability in spontaneous termination of cardiac fibrillation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 290, n. 1, p. H255, 2006.
- RIPPLINGER, C. M.; EFIMOV, I. R. The virtual electrode hypothesis of defibrillation. *Cardiac Bioelectric Therapy*, p. 331-356, 2009.
- SCHOENBERGER, R. A.; VON PLANTA, M.; VON PLANTA, I. Survival after failed out-of-hospital resuscitation. *Journal of Emergency Medicine*, v. 3, n. 13, p. 427, 1995.
- 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, n. 2, p. 477-492, 2002.
- SILVERTHORN, D. U. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. Artmed editora, 2010.

- SMITH, K. C.; NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. *Biophysical journal*, v. 86, n. 5, p. 2813-2826, 2004.
- STEINHARDT, R.; BI, G; ALDERTON, J. Cell Membrane Resealing by a Vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science*, v. 263, p. 390–393, 1985.
- TOGO, T. et al. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *Journal of Cell Science*, v. 112, n. 5, p. 719-731, 1999.
- TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. *Biophysical journal*, v. 60, n. 2, p. 297-306, 1991.
- 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, 1991.
- TUNG, L. Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle. *Proceedings of the IEEE*, v. 84, n. 3, p. 366-378, 1996.
- TURAKHIA, M.; TSENG, Z. H. Sudden cardiac death: epidemiology, mechanisms, and therapy. *Current problems in cardiology*, v. 32, n. 9, p. 501-546, 2007.
- VAN ALEM, A. P.; POST, J.; KOSTER, R. W. VF recurrence: characteristics and patient outcome in out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*, v. 59, n. 2, p. 181-188, 2003.
- VIANA, M. A. et al. System for open-chest, multidirectional electrical defibrillation. *Research on Biomedical Engineering*, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.
- WEAVER, J. C. Molecular basis for cell membrane electroporation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 720, n. 1, p. 141-152, 1994.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Yu A. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, v. 41, n. 2, p. 135-160, 1996
- WEISZ, M. T. Physical principles of defibrillators. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, v. 10, n. 8, p. 367-369, 2009.
- YABE, S. et al. Conduction disturbances caused by high current density electric fields. *Circulation Research*, v. 66, n. 5, p. 1190-1203, 1990.
- ZIMMERMANN, U. et al. Effects of external electrical fields on cell membranes. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, v. 3, n. 1, p. 58-83, 1976.
- ZIPES, D. P. et al. 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, 1975.
- ZIPES, D. P. et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *Journal of the American College of Cardiology*, v. 48, n. 5, p. e247-e346, 2006.

Anexos



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeito da direção do campo elétrico sobre a letalidade de miócitos isolados**", protocolo nº **4093-1(K)**, sob a responsabilidade de **Dr. Pedro X. Oliveira / Fernanda S. C. Leomil**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **16 de dezembro de 2015**.

Vigência do projeto: 01/2016-12/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar UnibHan

No. de animais: 44

Idade/Peso: 03 meses / 300g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 16 de dezembro de 2015.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

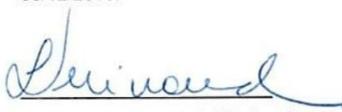
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos (protocolo CEUA/UNICAMP nº 4429-1), de responsabilidade da Dra. Rosana Almada Bassani, assim como os adendos abaixo discriminados, tiveram a solicitação de prorrogação aceita pela CEUA/UNICAMP, de 02/01/2017-31/03/2018 para 01/02/2017-30/06/2019.

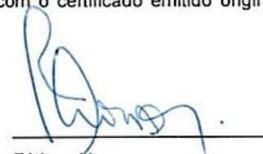
- 4429-1(A) - Regulação do cronotropismo atrial e do inotropismo ventricular durante o desenvolvimento pós-natal de ratos, executora Elizângela Souto Oliveira / Natalia F.Oshiyama
- 4429-1(B) - Dinâmica de Na⁺ e modelo matemático de potencial de ação ventricular, executora Natalia F.Oshiyama
- 4429-1(C) - Análise do efeito de agentes antineoplásicos sobre a mobilização de cálcio em miócitos ventriculares isolados, executora Natalia F.Oshiyama
- 4429-1(D) - Influência da forma de onda estimulatória nos efeitos deletérios de choques elétricos sobre miócitos cardíacos isolados, co-responsável Prof. Dr. José W. M. Bassani, executor Jair T. Goulart
- 4429-1(E) - Proteção miocárdica contra choques desfibrilatórios, co-responsável Prof. Dr. José W. M. Bassani, executor Ahmad Almazloum
- 4429-1(D) - Interação entre transportadores de cálcio no miocárdio de ratos miocárdicos durante o envelhecimento, co-responsável Prof. Dr. José W. M. Bassani, executor Jair T. Goulart
- 4429-1(G) - Implementação, avaliação e comparação dos modelos de força de contração e/ou encurtamento celular para miócito ventricular de rato, co-responsável Prof. Dr. José W. M. Bassani, executor Robson Rodrigues da Silva
- 4429-1(H) - Relação entre regime alimentar e adiposidade em ratos Wistar, executores Elizângela S. Oliveira e Lara L. Suassunae

Retifica ainda a idade e peso dos animais:

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	02/01/2017-30/06/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	02/01/2017-30/06/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	90
Peso / Idade:	04 meses / 400g
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	20
Peso / Idade:	18 meses / 650g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 06/12/2016.


Prof. Dra. Liana M. C. Verinaud
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Campinas, 30 de janeiro de 2017.



INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP - CEUA/UNICAMP - informa que está autorizado o uso de células cardíacas isoladas de ratos adultos, excedentes do protocolo CEUA 4429-1 - Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos, de responsabilidade da Dra. Rosana Almada Bassani, pelo Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira.

Ressaltamos que o isolamento e uso destas células está previsto no formulário referente ao protocolo CEUA 4429-1, aprovado pela CEUA/UNICAMP em 06/12/2016.

Campinas, 18 de janeiro de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Liana".

Profa. Dra. LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD
Presidente da CEUA/UNICAMP