



MARCELO ZOCCOLER

**ESTUDO ESPAÇO-TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO
CITOSÓLICO DE MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS EXPOSTOS A
CAMPOS ELÉTRICOS DE ALTA INTENSIDADE**

***SPATIO-TEMPORAL STUDY OF CYTOSOLIC CALCIUM
CONCENTRATION IN ISOLATED CARDIOMYOCYTES EXPOSED TO
HIGH INTENSITY ELECTRIC FIELDS***

**CAMPINAS
2014**



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

MARCELO ZOCCOLER

**ESTUDO ESPAÇO-TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO CITOSÓLICO
DE MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS EXPOSTOS A CAMPOS ELÉTRICOS DE
ALTA INTENSIDADE**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira

***SPATIO-TEMPORAL STUDY OF CYTOSOLIC CALCIUM
CONCENTRATION IN ISOLATED CARDIOMYOCYTES EXPOSED TO HIGH
INTENSITY ELECTRIC FIELDS***

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

*Master dissertation presented to the Electrical Engineering
Postgraduation Programm of the School of Engineering Electrical of the University of Campinas
to obtain the M.Sc grade in Engineering Electrical, in field of Biomedical Engineering.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO MARCELO ZOCCOLER
E ORIENTADO PELO PROF. DR. PEDRO XAVIER DE OLIVEIRA

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

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

Z72e Zoccoler, Marcelo, 1987-
Estudo espaço-temporal da concentração de cálcio citosólico de miócitos cardíacos isolados expostos a campos elétricos de alta intensidade / Marcelo Zoccoler. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Miócitos cardíacos. 2. Desfibriladores. 3. Campos elétricos. 4. Cálcio. 5. Fluorescência. I. Oliveira, Pedro Xavier de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Spatio-temporal study of cytosolic calcium concentration in isolated cardiomyocytes exposed to high intensity electric fields

Palavras-chave em inglês:

Cardiomyocytes

Defibrillation

Electric field

Calcium

Fluorescence

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Mestre em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Pedro Xavier de Oliveira [Orientador]

Paulo Alberto Paes Gomes

Diogo Coutinho Soriano

Data de defesa: 31-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE MESTRADO

Candidato: Marcelo Zoccoler

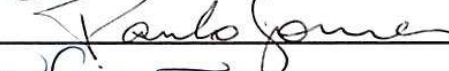
Data da Defesa: 31 de julho de 2014

Título da Tese: "Estudo Espaço-Temporal da Concentração de Cálcio Citosólico de Miócitos Cardíacos Isolados Expostos a Campos Elétricos de Alta Intensidade"

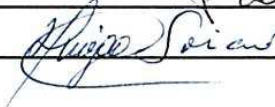
Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira (Presidente):



Dr. Paulo Alberto Paes Gomes:



Prof. Dr. Diogo Coutinho Soriano:



RESUMO

A fibrilação ventricular é um quadro extremamente grave de ameaça imediata à vida e a única terapia efetiva para sua reversão é a desfibrilação, que consiste na aplicação de campos elétricos (**E**) de alta intensidade sobre o coração. Este procedimento é capaz de restabelecer o sincronismo do coração, mas ele pode causar lesão em miócitos. A lesão depende da direção de **E** e é atribuída à eletroporação - formação de poros hidrofílicos na membrana celular - que leva a um aumento expressivo da concentração de íons Ca^{2+} livres no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), resultante de influxo de Ca^{2+} extracelular pelos poros. Neste trabalho, produzimos um sistema de microfluorimetria capaz de registrar imagens de fluorescência de miócitos cardíacos isolados e estudamos a lesão causada por **E** de alta intensidade por meio do aumento da fluorescência associada a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em miócitos orientados longitudinalmente e transversalmente a **E**. As células foram carregadas com o indicador de fluorescência Fluo-3, estimuladas a 0,5Hz por **E** de baixa intensidade antes da aplicação de um pulso de **E** de alta intensidade sub-letal. As imagens de fluorescência foram capturadas por uma câmera EMCCD e processadas por um *software* específico desenvolvido neste trabalho. O *software* utilizou dois métodos de análise: média de fluorescência normalizada e razão de uma área que mostrou aumento significativo de fluorescência dividida pela área total da célula. Análise de regiões de interesse (ROIs) voltadas para o ânodo e o cátodo produziu resultados em concordância com a literatura, com maior lesão (inferida por aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$) no lado do ânodo ($P < 0,05$ nos dois os métodos). A comparação entre os grupos longitudinal e transversal apresentou diferença estatística relevante no método da razão de áreas, o que não ocorreu pelo método de média de fluorescência. Imaginamos que a utilização de uma técnica mais direta para medir eletroporação possa solidificar esta correlação entre orientação e lesão. A compreensão dos mecanismos responsáveis pela severidade das lesões é importante para desenvolver terapias mais seguras.

Palavras-chave: miócitos cardíacos, desfibrilação, campo elétrico, cálcio, fluorescência.

ABSTRACT

*Ventricular fibrillation is an extremely dangerous immediate life-threatening condition and the only effective therapy to its reversion is defibrillation, which consists in applying high intensity electric fields (**E**) on the heart. Such procedure is capable of reestablishing heart synchronism, but it may also cause lesion in myocytes. Lesion is associated to **E** direction and is assigned to electroporation - generation of hydrophilic pores across the membrane caused by high intensity **E** - which results in an expressive increase in cytosol free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), a consequence from extracellular Ca^{2+} influx through the pores. In this work, we produced a microfluorimetry system capable of recording isolated cardiomyocytes fluorescence images and studied lesion caused by high intensity **E** by the means of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ associated fluorescence in myocytes oriented longitudinally and transversally to **E**. Cells were loaded with fluorescent dye Fluo-3, paced at 0,5Hz with low intensity **E** before setting one sub-lethal high intensity **E** pulse. Fluorescence images were recorded by an EMCCD camera and processed by a specific software developed in this work. The software used two analysis methods: normalized fluorescence average and a ratio of an area showing most significant fluorescence increase divided by cell total area. Regions of interest (ROIs) analysis facing the anode and the cathode has produced results in accordance with literature, presenting higher lesion (inferred by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase) at anode side ($P < 0,05$ in both methods). Comparison between longitudinal and transversal groups has presented relevant statistic difference when the ratio of areas method was employed, which has no happened when employing the fluorescence average method. We imagine that using a straight-forward technique for assessing electroporation may solidify this correlation between orientation and lesion. The understanding of the mechanisms responsible for lesion severity is important to develop safer therapies.*

Keywords: *cardiomyocytes, defibrillation, electric field, calcium, fluorescence.*

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
AGRADECIMENTOS	XV
LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE TABELAS	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XXV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 PROPRIEDADES DE CÉLULAS EXCITÁVEIS	1
1.2 O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO	2
1.3 O DESENVOLVIMENTO DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	5
1.4 A ATIVIDADE ELÉTRICA DO CORAÇÃO	7
1.5 ELETROPORAÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 ANIMAIS	15
3.2 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	15
3.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS.....	16
3.4 INSTRUMENTAÇÃO	16
3.4.1 Câmara de Perfusão	17
3.4.2 Bloco de Estimulação	18
3.4.3 Sistema de Microfluorimetria	19
3.4.3.1 Fonte de Luz, filtro anti-calórico e shutter	19
3.4.3.2 Filtros Ópticos e Suporte para Cubos Ópticos	22
3.4.3.3 Trocador de Lentes Objetivas e LED	24
3.4.3.4 Câmera com sensor EMCCD.....	24
3.4.3.5 Bancada de Trabalho Escura	25
3.5 <i>SOFTWARE</i> DE ANÁLISE.....	26
3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40

3.7 CÁLCULO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRANA.....	42
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	44
4.2 <i>SOFTWARE</i> DE ANÁLISE	46
4.3 FORMATO DAS ROIS	51
4.4 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS	54
4.4.1 Comparação da Fluorescência Entre Ânodo e Cátodo	54
4.4.2 Comparação da Fluorescência entre Grupos Longitudinal e Transversal	55
5 DISCUSSÃO	61
5.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	61
5.2 <i>SOFTWARE</i> DE ANÁLISE	64
5.3 ASSIMETRIA ENTRE ÂNODO E CÁTODO	65
5.4 GRUPOS LONGITUDINAL E TRANSVERSAL.....	68
6 CONCLUSÕES.....	71
7 REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO A – CURVA DE TRANSMITÂNCIA DE LENTE OBJETIVA 40X.....	79
ANEXO B - CERTIFICADOS DE COMITÊ DE ÉTICA	80

Dedico este trabalho aos meus pais, José Antonio e Izilda, e ao meu irmão Matheus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, José Antonio B. Zoccoler e Izilda M. P. Zoccoler, e ao meu irmão, Matheus Zoccoler, por me incentivarem nos estudos, pelo carinho e por acreditarem no meu potencial.

Agradeço também a todas as pessoas que tiveram, de alguma forma, participação neste trabalho ou que colaboraram com sugestões, incentivos, compreensão e apoio:

ao professor Pedro Xavier de Oliveira pela sábia orientação, ensinamentos, paciência e compreensão;

a todos os professores do Centro de Engenharia Biomédica e do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial aos professores José W. M. Bassani e Rosana A. Bassani por estimados ensinamentos e sugestões, e à professora Vera da Silveira N. Button pelos ensinamentos e orientação anterior;

a todos os amigos, funcionários e técnicos do Centro de Engenharia Biomédica e do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial a Elizângela Souto de Oliveira, Renato da Silva Moura, Márcia A. Queiroz e Carlos Alberto L. da Silva pela excelente dedicação e discussões de grande relevância para este projeto;

aos amigos e colegas pelas sugestões, incentivos e bons momentos, em especial a Arnaldo F. Neto, Carina M. Germer, Daniel D. Dittmar, Fabiana Omuro, Fagner N. Bezerra, Fernando O. Andrade, Hugo F. M. Milan, Jaime F. Prado Junior, Jair T. Goulart, João Carlos M. de Almeida, Luiza Naiara S. do Prado, Marcelo de Almeida Viana, Michele Almeida, Raphael F. Casseb e Victor H. B. Tsukahara;

ao apoio financeiro da FAEPEX pela bolsa de estudos;

ao apoio financeiro da FAPESP no projeto;

a todos que sempre me apoiaram.

“One repays a tender teacher badly if one always remains a pupil”
(Friedrich Nietzsche)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Formas de onda típicas de PA, $[Ca^{2+}]_i$ e contração de miócito ventricular de coelho (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).	3
Figura 1.2: Fluxos de Ca^{2+} num miócito cardíaco iniciado durante um PA (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).	4
Figura 1.3: Diferentes formas de onda de potenciais de ação no coração.	8
Figura 1.4: Sequência de etapas da eletroporação de uma membrana constituída de bi-camada fosfolípídica: formação de poro hidrofóbico e transformação em poro hidrofílico (modificado de Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008, licença número 3411460598083).	10
Figura 1.5: A. Ilustração da interação entre dois fosfolípides na membrana. B. Energia livre média de uma molécula de fosfolípide (μ) pela área efetiva da molécula (a). Curva I representa a relação na ausência de campo elétrico externo. Curva II representa a relação na presença de um campo elétrico através da membrana de intensidade E_a . $a_m(0)$ e $a_m(E_a)$ são os pontos de equilíbrio com mínima energia (modificado de Lewis, © 2003 IEEE).	12
Figura 1.6: Ilustração de influxo extra de Ca^{2+} num miócito cardíaco por poros no sarcolema (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).	13
Figura 3.1: Montagem experimental: câmara de perfusão; sistema de microfluorimetria; bloco de estimulação.	17
Figura 3.2: Câmara de perfusão sobre o <i>chariot</i> do microscópio.	18
Figura 3.3: Desenho da caixa da lâmpada halógena (modificado de Zeiss, 2014).	20
Figura 3.4: Espectro de emissão de lâmpada halógena (modificado de Zeiss, 2014).	21
Figura 3.5: Espectro de transmissão do filtro anti-calórico SCHOTT KG1.	21
Figura 3.6: Características do conjunto de filtros ópticos Zeiss (46 HE): transmitância de filtro de excitação em azul, espelho dicróico em cinza e filtro de emissão em vermelho; eficiência de excitação do Fluo-3 em laranja e de emissão do Fluo-3 em verde (modificado de Zeiss, 2014b).	23
Figura 3.7: Cubo para filtros ópticos.	23
Figura 3.8: Câmera com sensor EMCCD.	25
Figura 3.9: Desenho da bancada de trabalho escura (sem cortina) com o sistema de microfluorimetria.	26

Figura 3.10: Fluxograma simplificado do <i>software</i> de análise de vídeos de fluorescência. IMVF: Imagem Média da Variação de Fluorescência em resposta a estímulos de baixa intensidade. Imagem do Choque: imagem no pico de fluorescência pós-choque.....	27
Figura 3.11: Gráfico da média de fluorescência pelo tempo. $\Delta F_{\text{transiente}}$: variação de fluorescência em resposta a estímulo de baixa intensidade. ΔF_{choque} : variação de fluorescência em resposta a estímulo de alta intensidade.	28
Figura 3.12: Fluxograma do Bloco "Cria IMVF".....	29
Figura 3.13: Gráfico exemplo da média de fluorescência pelo tempo com decaimento da linha de base (desbotamento).....	31
Figura 3.14: Fluxograma do Bloco "Cria Máscara da Célula e ROIs do Ânodo e Cátodo".....	32
Figura 3.15: Fluxograma do Bloco "Elimina Plano de Fundo, Calcula Médias de Fluorescência e Define Imagem do Choque".....	35
Figura 3.16: Fluxograma do Bloco "Calcula Aumento Limiar e Pinta Pixels com Aumento Superior ao Limiar".....	37
Figura 3.17: Fluorescência Média Normalizada na ROI do ânodo em função do tempo: aumento máximo de fluorescência (AMF). $\Delta F_{\text{choque_ânodo}}$ está igual a AMF neste caso porque o gráfico está normalizado pela média de fluorescência de IMOFT na ROI do ânodo, que é $\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$. Na ROI do cátodo e na célula inteira, essa igualdade não ocorre.....	39
Figura 3.18: Etapas do Protocolo Experimental.	40
Figura 4.1: A. Foto do sistema de microfluorimetria com os principais componentes indicados. B. Foto do sistema com bancada de trabalho escura.....	44
Figura 4.2: Interface inicial do <i>software</i>	46
Figura 4.3: Fluxograma operacional do <i>software</i> de análise.	48
Figura 4.4: Interface do <i>software</i> após abertura de vídeo.	49
Figura 4.5: Interface do <i>software</i> após seleção de imagens de referência e desenho das ROIs. ..	50
Figura 4.6: Interface do <i>software</i> pós-processamento.	51
Figura 4.7: Comparação entre as ROIs geradas pelo <i>software</i> desenvolvido e ROIs geométricas: A. Imagem de fluorescência de miócito após aplicação de E longitudinalmente ao maior eixo da célula. ROIs do ânodo em azul (gerada pelo <i>software</i> desenvolvido) e ciano (quadrada). ROIs do cátodo em verde (gerada pelo <i>software</i> desenvolvido) e amarelo (quadrada). B. Médias e erros padrão da média do grupo longitudinal para as ROIs geradas pelo <i>software</i> desenvolvido. C.	

Médias e erros padrão da média do grupo longitudinal para as ROIs quadradas. D. Imagem de fluorescência de miócito após aplicação de E transversalmente ao maior eixo da célula. ROIs do ânodo em azul (gerada pelo *software* desenvolvido) e ciano (retangular). ROIs do cátodo em verde (gerada pelo *software* desenvolvido) e amarelo (retangular). E. Médias e erros padrão da média da fluorescência das ROIs para o grupo transversal para as ROIs geradas pelo *software* desenvolvido. F. Médias e erros padrão da média da fluorescência das ROIs para o grupo transversal para as ROIs retangulares..... 53

Figura 4.8: A. Gráfico da fluorescência média normalizada em função do tempo de uma célula, para ROI do ânodo e ROI do cátodo. A seta indica o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade. B. Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da fluorescência média do pico de fluorescência pós-choque normalizada ($n=10$), para ROI do ânodo e ROI do cátodo. C. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total em função do tempo, para ROI do ânodo e ROI do cátodo. D. Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total após a aplicação do choque ($n=10$), para ROI do ânodo e ROI do cátodo. Asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)..... 55

Figura 4.9: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais), para células orientadas nas direções longitudinal ($n=5$) e transversal ($n=5$) em relação às linhas de campo elétrico, dos seguintes fatores: A. comprimento do maior eixo ($2c$). B. comprimento do menor eixo ($2a$). C. Campo elétrico limiar (E_T). D. Variação máxima do potencial transmembrana (ΔV_{maxT}) após estímulo limiar. Asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$)..... 56

Figura 4.10: A. Imagem do miócito sem fluorescência com maior eixo orientado longitudinalmente às linhas de campo elétrico. Seta branca indica a direção do campo elétrico aplicado. B. Imagem de fluorescência da célula após estímulo de baixa intensidade. C. Mesma imagem de fluorescência tratada com filtro gaussiano e com ROIs do ânodo (azul) e do cátodo (verde) desenhadas sobre imagem. D. Imagem de fluorescência pós-processamento, com pixels que ultrapassam o limiar pintados de vermelho, após estímulo de baixa intensidade. E. Imagem pós-processamento após aplicação do estímulo de alta intensidade (choque). F. Gráfico da fluorescência média normalizada pelo tempo para as ROIs do ânodo e do cátodo. G. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total para a célula inteira, ROI do ânodo e na ROI do cátodo. As setas pretas indicam o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade. 57

Figura 4.11: A. Imagem do miócito sem fluorescência com maior eixo orientado transversalmente às linhas de campo elétrico. Seta branca indica a direção do campo elétrico aplicado. B. Imagem de fluorescência da célula após estímulo de baixa intensidade. C. Mesma imagem de fluorescência tratada com filtro gaussiano e com ROIs do ânodo (azul) e do cátodo (verde) desenhadas sobre imagem. D. Imagem de fluorescência pós-processamento, com pixels que ultrapassam o limiar pintados de vermelho, após estímulo de baixa intensidade. E. Imagem pós-processamento após aplicação do estímulo de alta intensidade (choque). F. Gráfico da fluorescência média normalizada pelo tempo para as ROIs do ânodo e do cátodo. G. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total para a célula inteira, ROI do ânodo e na ROI do cátodo. As setas pretas indicam o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade.

..... 58

Figura 4.12: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da fluorescência média normalizada (A.) e da razão da área que ultrapassou o limiar sobre a área total (B.) pós-choque, para células orientadas nas direções longitudinal (n=5) e transversal (n=5) em relação às linhas de campo elétrico, analisadas nas regiões da ROI do ânodo e da ROI do cátodo. 60

Figura 5.1: Assimetria na formação de poros entre membrana voltada para pólo positivo e negativo (modificado de Teruel & Meyer, 1997, licença número 3411470026619)..... 67

Figura A.1: Curva de transmitância de lente objetiva 40x/0.75 (modificado de Zeiss, 2014c).... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Características dos grupos: média \pm erro padrão de $2c$, $2a$, E_T e $\Delta V_{\max T}$. O asterisco indica $P < 0,05$	56
Tabela 4.2: Média \pm erro padrão da média da fluorescência média normalizada e da razão de áreas para os grupos longitudinal e transversal, analisadas em ROI do ânodo e ROI do cátodo.	59
Tabela 5.1: Custos do microscópio produzido.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $[Ca^{2+}]_i$ - concentração citosólica de Ca^{2+} livre
- ΔF_{choque} - variação de fluorescência pós-choque
- $\Delta F_{\text{choque_ânodo}}$ - média de fluorescência na ROI do ânodo para a IMVF
- $\Delta V_{\text{máx}}$ - variação do potencial transmembrana máximo
- $\Delta V_{\text{máxT}}$ - variação do potencial transmembrana máximo limiar
- $\Delta F_{\text{transiente}}$ - variação de fluorescência evocada por estímulo de baixa intensidade
- $\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$ - média de fluorescência na ROI do ânodo para a Imagem do Choque
- μ - energia livre média de fosfolípide
- 2a - comprimento do menor eixo
- 2c - comprimento do maior eixo
- a - área efetiva de fosfolípide
- AMF - aumento máximo de fluorescência
- ATP - trifosfato de adenosina
- AV - átrio-ventricular
- CEB - Centro de Engenharia Biomédica
- CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
- Cpl-P - solução cardioplégica
- DMSO - dimetilsulfóxido
- E - campo elétrico
- EAI - estimulador de alta intensidade
- EBI - estimulador de baixa intensidade
- EGTA - ácido etileno glicol tetracético
- EM - *Electron Multiplying*
- EMCCD - *Electron Multiplying Charged Coupled Device*
- E_T - campo elétrico limiar
- FITC - fluoresceína isocianetada
- F - intensidade de fluorescência medida
- $F_{\text{máx}}$ - intensidade de fluorescência do Fluo-3 em concentração saturante de Ca^{2+}
- $F_{\text{mín}}$ - intensidade de fluorescência do Fluo-3 na ausência de Ca^{2+} (solução com EGTA)

HD - disco rígido

IM_{Base} - Imagem Média das imagens de fluorescência na linha de base

IM_{Picos} - Imagem Média das imagens de pico de fluorescência

IMVF - Imagem Média de Variação de Fluorescência

K_d - constante de dissociação de um íon

LED - diodo emissor de luz

NT - solução de Tyrode normal

NT-Fluo - solução Fluo-3 para incubação de miócitos

PA - potencial de ação

RAM - *random access memomry*

RGB - *red-green-blue*

ROIs - regiões de interesse

RS - retículo sarcoplasmático

RyR - receptores de rianodina

SA - sino-atrial

SERCA - ATPase de Ca²⁺ do retículo sarco/endoplasmático

t_{1/2} - tempo para queda da metade da fluorescência

TyCI - solução de Tyrode para isolamento de células

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

V_m - diferença de potencial elétrico

1 INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, a expectativa de vida mundial subiu cerca de 6 anos (World Health Organization, 2014). Esse aumento se deve principalmente à diminuição das mortes por doenças infecciosas em países de baixa renda. Em países de alta renda, o aumento ocorreu principalmente devido ao maior sucesso em lidar com doenças não transmissíveis. Apesar deste contraste, quase todos os países estão adquirindo uma maior proporção de mortes por doenças não transmissíveis e feridas no lugar de doenças infecciosas. Inclusive, das 3 principais causas de mortes prematuras no mundo - doenças coronárias cardíacas (1^a), infecções pulmonares, como pneumonia (2^a) e derrames (3^a) - duas correspondem a doenças não transmissíveis, mais especificamente, doenças cardiovasculares. As doenças cardiovasculares ainda são as principais causas de morte na Europa (Allender, et al., 2008), nos Estados Unidos (Lloyd-Jones, et al., 2010) e no mundo (Global Health Observatory (GBO), 2008). Elas podem causar isquemia no tecido cardíaco (Rocco, et al., 1987), o que pode comprometer o desempenho do coração por meio de arritmias (Schwartz, Billman, & Stone, 1984).

1.1 PROPRIEDADES DE CÉLULAS EXCITÁVEIS

O ritmo cardíaco é determinado, primariamente, por um grupo de células excitáveis marca-passo localizadas no nódulo sino-atrial (SA) do coração (Silverthorn, 2009). As células excitáveis do tecido cardíaco são denominadas miócitos cardíacos ou cardiomiócitos. Assim como outras células excitáveis, como neurônios, elas apresentam, em repouso, uma diferença de potencial elétrico (V_m) através de sua membrana plasmática, ou sarcolema, sendo o lado interno cerca de várias dezenas de mV mais negativo que o lado externo (em torno de -80mV para miócitos atriais e ventriculares, Bers D. M., 2001). Essa diferença é mantida aproximadamente constante graças às diferenças de concentração de íons dentro e fora da célula e à permeabilidade seletiva da membrana. Essas duas condições geram, respectivamente, gradientes de concentração e elétrico em direções opostas que, eventualmente, atingem um estado de equilíbrio (Keynes, Aidley, & Huang, 2011). Este equilíbrio de cargas e concentração de moléculas entre os meios intra e extracelular resulta na capacidade da membrana plasmática em manter V_m não-nulo.

Entretanto, este equilíbrio pode ser perturbado, por exemplo, por variações nas concentrações dos íons ou estimulação elétrica. Visto que a membrana plasmática é essencialmente constituída de uma bicamada fosfolipídica - atravessada, parcial ou totalmente, por diversas proteínas - sob o ponto de vista elétrico, ela é basicamente um isolante, com uma capacitância elétrica estimada em $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Keynes, Aidley, & Huang, 2011). Assim, um campo elétrico (E) externo é capaz de despolarizar a membrana, diminuindo a diferença de potencial. Além disso, a propriedade semipermeável da membrana é decorrente do fato de algumas das proteínas que atravessam a membrana serem canais, que permitem a passagem de íons específicos, como K^+ , Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} . E mais, muitos desses canais têm uma probabilidade maior de estarem abertos ou fechados dependendo do valor de V_m . Portanto, um E externo pode induzir uma maior abertura ou fechamento de canais iônicos na membrana.

Se uma perturbação causa uma diminuição considerável na magnitude de V_m , isto é, despolariza a membrana até um certo limiar, ocorrem mudanças nas permeabilidades aos íons por causa da abertura e fechamento de canais iônicos. Isto pode culminar numa onda que despolariza e repolariza a membrana, chamada potencial de ação (PA).

1.2 O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO

Durante um PA cardíaco, ocorre um influxo de Ca^{2+} , que provoca um aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e este aumento desencadeia a contração das unidades contráteis da célula cardíaca, denominadas sarcômeros. O perfil e ordem de ocorrência desses eventos é mostrado na Figura 1.1.

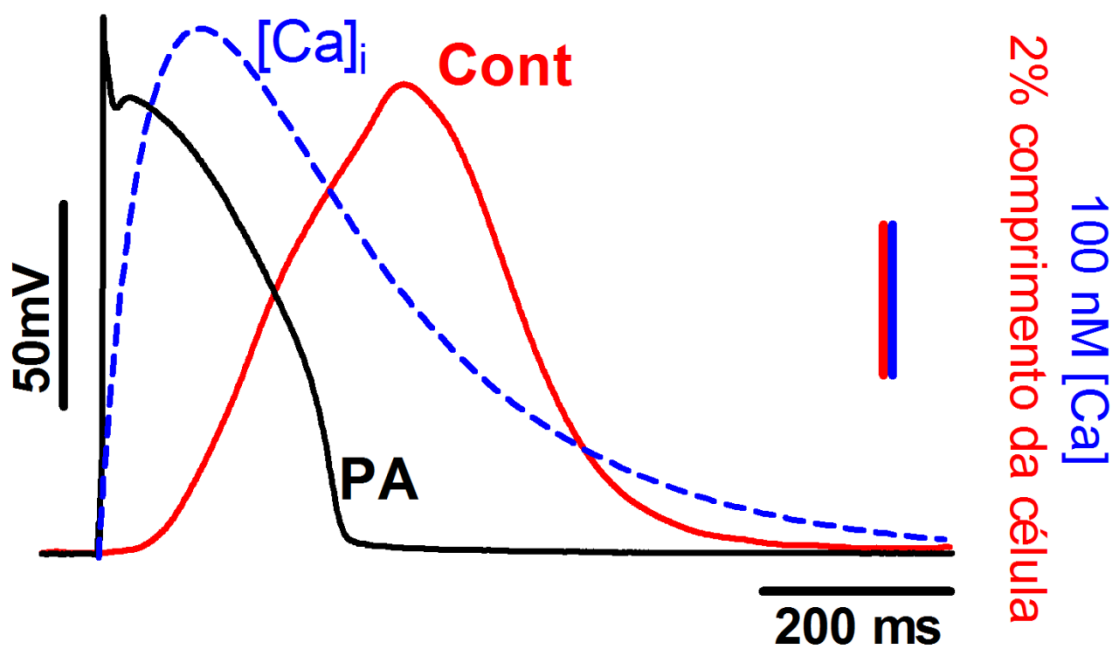


Figura 1.1: Formas de onda típicas de PA, $[Ca^{2+}]_i$ e contração de miócito ventricular de coelho (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).

Os principais fluxos de Ca^{2+} num miócito cardíaco são mostrados na Figura 1.2. A despolarização do sarcolema causada pelo PA induz a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão. Como a concentração de Ca^{2+} no meio extracelular é mais elevada que aquela do meio intracelular, íons cálcio se deslocam para o interior da célula através destes canais, seguindo o gradiente de concentração. Isto aumenta a concentração de Ca^{2+} nas regiões internas próximas da membrana. O retículo sarcoplasmático (RS) contém cálcio ligado a proteínas em seu interior, e em sua membrana existem dois complexos protéicos com um papel importante na regulação de $[Ca^{2+}]_i$: canais receptores de rianodina (RyR) e SERCA. Os canais RyR facilitam a liberação de Ca^{2+} interno do RS quando Ca^{2+} se liga a eles, efeito conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio (*Ca-Induced Ca-Release*, ou CICR, Bers D. M., 2001). Em miócitos cardíacos, os RyR se localizam próximos de canais de Ca^{2+} do sarcolema (Scriven, Asghari, Schulson, & Moore, 2010) de modo que um ligeiro aumento da entrada de Ca^{2+} causado pela abertura de canais de Ca^{2+} do sarcolema provoca um aumento da abertura do canais RyR do RS e aumento suplementar de $[Ca^{2+}]_i$. Este aumento da concentração estimula a contração dos sarcômeros (unidade contrátil da célula). Os deslocamentos de Ca^{2+} descritos neste parágrafo são ilustrados por setas vermelhas na Figura 1.2.

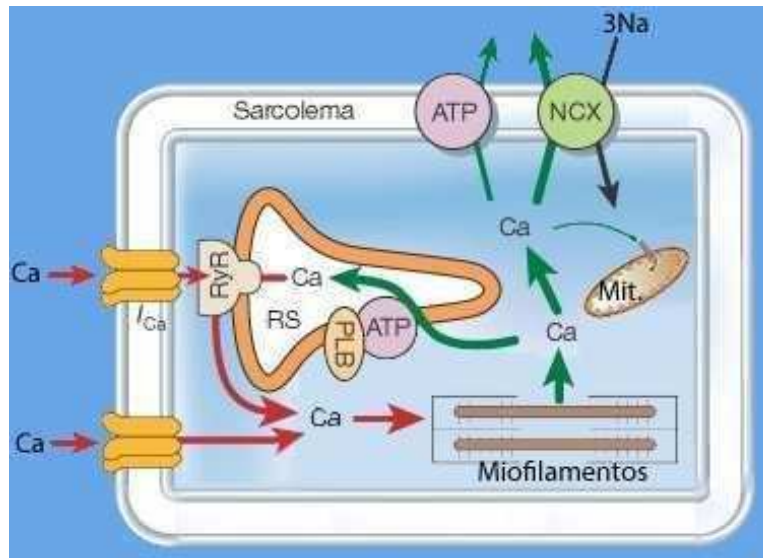


Figura 1.2: Fluxos de Ca^{2+} num miócito cardíaco iniciado durante um PA (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).

Os sarcômeros contém os miofilamentos: cadeias lineares e paralelas de proteínas (actina e miosina). A contração do sarcômero ocorre quando as "cabeças" das moléculas de miosina se ligam temporariamente às cadeias de actina e exercem uma força de tração sobre elas. Para que essa ligação ocorra, é necessário que os sítios de ligação para miosina dos filamentos de actina fiquem disponíveis, porém eles normalmente são bloqueados pelo complexo protéico troponina-tropomiosina, somente ficando expostos quando Ca^{2+} se liga a uma sub-unidade da troponina (troponina C). Portanto, o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é fundamental para expor esses sítios de ligação e efetuar a contração do sarcômero, embora também seja necessário o consumo de trifosfato de adenosina (ATP) para liberar a ligação actina-miosina e permitir a realização de uma força de tração sequente (Keynes, Aidley, & Huang, 2011).

Assim como o Ca^{2+} é importante para a contração, o relaxamento também depende dele: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve diminuir para que os sarcômeros voltem ao seu tamanho original. Existem alguns mecanismos de recaptação ou extrusão do Ca^{2+} . A SERCA, por meio do consumo de ATP, é a responsável por recarregar o RS com cálcio. Além disso, os próprios canais RyR possuem um outro sítio de ligação de Ca^{2+} , de resposta mais lenta, que resulta na inativação dos canais, cortando o vazamento do RS. A mitocôndria também capta uma pequena parcela de Ca^{2+} pelo *uniporter* mitocondrial. Por fim, Ca^{2+} é expulso do meio intracelular por dois mecanismos do

sarcolema: ATP-ase de cálcio e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Esses fluxos que resultam na diminuição de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são mostrados na Figura 1.2 por meio das setas verdes (Bers D. M., 2001).

Além de sua importância no processo de contração, em situações de rompimento do sarcolema, o Ca^{2+} participa do mecanismo de selamento da membrana porque tem papel ativo na exocitose (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, & Walter, 2008).

A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ também tem outra influência sobre a membrana plasmática: ela modula uma assimetria na distribuição dos diferentes tipos de fosfolípides entre as subcamadas interna e externa. Níveis elevados de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tendem a atrapalhar a manutenção dessa assimetria. A perda dessa assimetria é um importante mecanismo de sinalização e está associada à apoptose (Quinn, 2002).

1.3 O DESENVOLVIMENTO DA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A investigação e observação desses mecanismos celulares associados a $[\text{Ca}^{2+}]$ só se tornou possível com o desenvolvimento de uma técnica, acompanhada de instrumentação específica, capaz de rastrear os fluxos de íons ao longo de um experimento. Os microscópios ópticos produzidos até o início do século XX, baseados nos trabalhos pioneiros de Robert Hooke e Antonie van Leeuwenhoek, permitiam a observação de seres unicelulares que, devido a sua coloração translúcida, geralmente precisavam ser coloridos artificialmente com corantes. Embora corantes forneçam um aumento significativo no contraste, a fluorescência tem a capacidade de fornecer um contraste infinito. Entretanto, mesmo já tendo sido descrita desde o século XVI, ela ainda não dispunha de um equipamento capaz de revelá-la a níveis microscópicos. De fato, o primeiro corante fluorescente, a fluoresceína, foi sintetizado por Adolf von Bayer, em 1871, muito antes do primeiro microscópio de fluorescência ser produzido pelo físico Oskar Heimstädt, em 1911. Heimstädt se baseou nas observações de August Kölnner de que certos compostos, quando iluminados com luz ultra-violeta, emitiam luz em comprimentos de onda maiores. Heimstädt se serviu de uma série de filtros ópticos aplicados sobre uma lâmpada a arco voltaico para produzir um feixe de luz ultra-violeta, correspondendo à luz de excitação, e concomitantemente com a técnica de iluminação a campo escuro, para capturar exclusivamente a fluorescência emitida pela amostra (Nature, 2014).

Ainda assim, a revolução na observação dos mecanismos celulares só veio a ocorrer quando o investigador austríaco Max Haitinger junto com outros cientistas desenvolveram a técnica de fluorescência secundária, na qual eles aplicaram moléculas fluorescentes exógenas, chamadas fluoróforos ou fluorocromos, em amostras. Enquanto isso, avanço expressivo foi feito na instrumentação com o aperfeiçoamento de filtros ópticos capazes de garantir tanto a incidência da luz de excitação no comprimento de onda adequado sobre a amostra, bem como a filtragem da fluorescência emitida apenas pelos fluorocromos. Com isso, o farmacologista Philipp Ellinger e o anatomista August Hirt desenvolveram o protótipo do primeiro microscópio de epifluorescência, onde a luz de excitação reside no mesmo lado da lente objetiva em relação à amostra, de maneira que a objetiva serve tanto como caminho para iluminação e focalização da luz sobre a amostra quanto para a ampliação das imagens de fluorescência provenientes da emissão do fluoróforo (Nature, 2014).

Para que esse microscópio desempenhe com sucesso suas funções de iluminação da amostra e captura de fluorescência, alguns cuidados essenciais devem ser tomados. Primeiramente, o conjunto de filtros ópticos deve conter bandas passantes condizendo da melhor maneira possível com os picos dos espectros de excitação e emissão do indicador de fluorescência a ser utilizado. A fonte de luz também deve ser selecionada de maneira que ela gere a maior quantidade de luz possível nos comprimentos de onda correspondentes a banda passante do filtro de excitação e, conseqüentemente, ao pico do espectro de excitação do indicador de fluorescência. Por vezes, certas lâmpadas possuem picos de emissão que coincidem com picos do espectro de excitação de certos indicadores. Além disso, a lâmpada, lentes e filtros ópticos devem estar sempre apropriadamente alinhados. Deve-se usar sempre que possível lentes objetivas para fluorescência com abertura numérica relativamente grande a fim de aumentar a quantidade de luz captada da amostra. Como o sinal de fluorescência emitido pelos indicadores é fraco, iluminação ambiente deve ser bloqueada para que não entre na objetiva e gere ruído nas medidas da fluorescência. Em instantes onde não se está realizando medidas, a fonte de luz deve ser desligada ou bloqueada para impedir desbotamento (decaimento temporal da fluorescência devido à destruição de fluoróforos causada pela própria fonte de luz) desnecessário. Por fim, um filtro anti-calórico deve sempre estar posicionado entre a fonte de luz e o conjunto de filtros ópticos, visto que estes são sensíveis ao calor e à forte luz do iluminador (Zeiss, 2014d).

Com relação à medição da $[Ca^{2+}]_i$, o primeiro indicador de fluorescência com ligação a Ca^{2+} foi introduzido por Roger Y. Tsien (Tsien, 1980) e posteriormente denominado Quin2. Trata-se de um derivado do ácido etileno glicol tetracético (EGTA), um quelato seletivo a Ca^{2+} . Após alguns anos, Tsien e colaboradores introduziram Fura-2 e Indo-1, os quais apresentaram diversas melhorias em relação ao Quin2, tais como fluorescência mais forte, maior deslocamento de comprimentos de onda quando ligados a Ca^{2+} e melhor seletividade para o Ca^{2+} (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985). Em 1989, Tsien e colaboradores expandiram a gama de indicadores com o derivado do fluorocromo rodamina, Rhod-2, e derivados da fluoresceína, Fluo-2 e Fluo-3, todos indicadores não-raciométricos (exibem o deslocamento de espectro somente quando ligados ao íon) e com espectro de excitação dentro da região visível (Minta, Kao, & Tsien, 1989). Tais indicadores ainda são os mais utilizados para medições da $[Ca^{2+}]_i$.

1.4 A ATIVIDADE ELÉTRICA DO CORAÇÃO

O PA pode se propagar de uma célula para outra quimicamente através das sinapses ou eletricamente por meio de junções *gap*: interconexões das membranas de duas células que produzem um caminho de baixa resistência elétrica (Bers D. M., 2001). Esta última forma é normalmente como os PAs se propagam no coração.

A forma de onda do PA varia dependendo da região do tecido cardíaco, como mostra a Figura 1.3. Esta variação, juntamente com o instante do disparo em cada região, é de extrema importância para que o coração consiga bombear o sangue eficientemente.

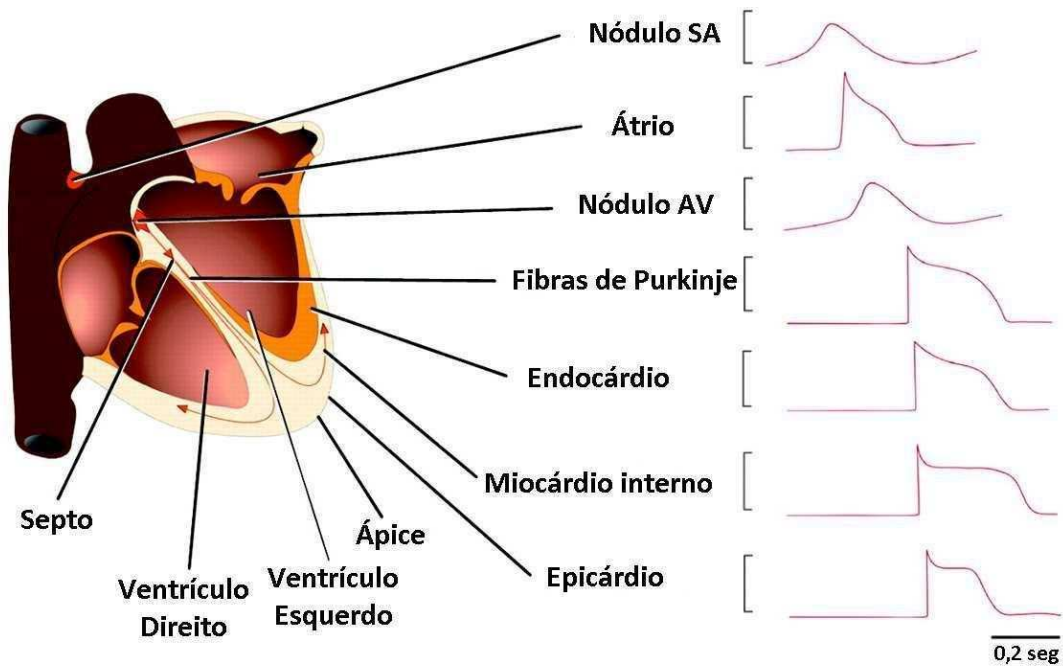


Figura 1.3: Diferentes formas de onda de potenciais de ação no coração.

As células marca-passo localizadas no nódulo SA disparam PAs num certo ritmo e induzem o disparo de PAs em células atriais próximas, que por sua vez estimulam outras células cardíacas próximas, e assim por diante. O resultado global deste fenômeno é uma onda de despolarização elétrica que se propaga pelo coração. A onda parte do nódulo sino-atrial, percorre os átrios até chegar ao nódulo átrio-ventricular (AV). A passagem dessa onda pelos átrios resulta na contração dos mesmos, o que bombeia o sangue para os ventrículos. A onda despolarizante desce pelo septo até o ápice do coração através das fibras de Purkinje para então percorrer os ventrículos no sentido inverso, do ápice para a base. Neste instante, as células dos átrios estão sendo repolarizadas e relaxando. A contração dos ventrículos ocorre de baixo para cima, exercendo uma pressão que fecha as válvulas de comunicação com os átrios, abre as válvulas para as artérias e ejeta o sangue do coração para os pulmões pelas artérias pulmonares, no caso do ventrículo direito, ou para o resto do corpo pela aorta, no caso do esquerdo (Silverthorn, 2009).

Perturbações ou bloqueios, mesmo parciais, de condução da onda despolarizante podem produzir reentrâncias - parte da onda retorna por um caminho que havia sido bloqueado e re-estimula uma região antes do momento normal de chegada da onda seguinte (Bers D. M., 2001). Fenômenos como esse dão origem a arritmias e podem causar fibrilação: contração dessincronizada das fibras musculares. Fibrilações atriais são mais comuns, mas, se não tratadas,

podem levar a derrames. Já a fibrilação ventricular é um quadro clínico extremamente grave de ameaça imediata à vida porque impede o bombeamento eficaz de sangue para o corpo (Silverthorn, 2009).

A única terapia conhecida para reversão do quadro de fibrilação ventricular é a desfibrilação, que consiste na aplicação de **E** de alta intensidade sobre o coração. Contudo, a estimulação por **E** de alta intensidade pode causar efeitos indesejados sobre o coração (depressão da função contrátil, necrose do tecido, distúrbios na condução do potencial de ação e outras alterações eletrofisiológicas), como já relatado em experimentos *in vivo* (Dahl, Ewy, Warner, & Thomas, 1974; Avitall, et al., 1990; Yabe, Smith, Daubert, Wolf, Rollins, & Ideker, 1990; Li, Jones, Yee, & Klein, 1991; Tang, Weil, Sun, Gazmuri, & Bisera, 1993; Gazmuri, Weil, Bisera, Tang, Fukui, & McKee, 1996; Xie, et al., 1997), em preparações miocárdicas multicelulares (Soares, 2003) e em células cardíacas isoladas (Jones, Lepeschkin, Jones, & Rush, 1978; Jones, Jones, & Balasky, 1987; Krauthamer & Jones, 1997; Cheng, Tung, & Sobie, 1999; Cheek & Fast, 2004; Oliveira, Bassani, & Bassani, 2008b; Tsai, Tang, & Sun, 2009).

Outros trabalhos mostram que a orientação de miócitos em relação a **E** influencia o limiar de estimulação (Bassani, Lima, Gomes, Oliveira, & Bassani, 2006) e a letalidade (Oliveira, Bassani, & Bassani, 2008b).

1.5 ELETROPORAÇÃO

Um dos fenômenos celulares relacionados com esses efeitos indesejados da lesão celular denomina-se eletroporação ou eletropermeabilização da membrana celular, causada por **E** de alta intensidade (Tung, 1996; Weaver & Chizmadzhev, 1996b; Chen, Smye, & Robinson, 2006).

As membranas celulares apresentam uma estrutura extremamente semelhante entre as mais diversas espécies: uma bicamada de fosfolípides, onde triglicina está ligada a duas cadeias de ácidos graxos (dupla cauda apolar) e a uma cabeça dipolar flexível.

Há um consenso de que, quando um **E** é aplicado através da membrana, ele induz uma diferença de potencial que, se ultrapassar um valor limiar ($\sim 1V$), causa uma drástica mudança na condutividade da membrana, permitindo a passagem de íons e outras moléculas (Zimmermann, Pilwat, Beckers, & Riemann, 1976; Abidor, Arakelyan, Chernomordik, Chizmadzhev,

Pastushenko, & Tarasevich, 1979; Kinosita Jr, et al., 1988; Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999). Esta mudança na condutividade é atribuída à formação de poros na membrana. A Figura 1.4 mostra as etapas da formação de um poro relativamente estável.

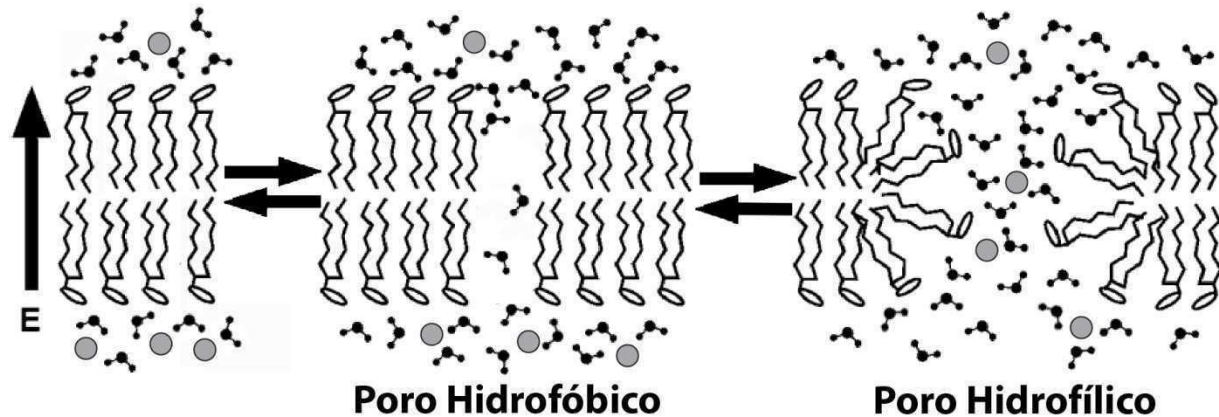


Figura 1.4: Sequência de etapas da eletroporação de uma membrana constituída de bi-camada fosfolipídica: formação de poro hidrofóbico e transformação em poro hidrofílico (modificado de Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008, licença número 3411460598083).

A aplicação de **E** pode alterar o estado de agitação das moléculas e permitir a formação de um poro hidrofóbico. Estes poros podem aparecer e evoluir espontaneamente, porém a aplicação de **E** favorece seu surgimento. Além disso, estes poros são reversíveis, de modo que a membrana pode voltar à sua conformação inicial passivamente. Entretanto, um poro hidrofílico pode se tornar estável se seu raio for muito grande. Neste caso, o mecanismo de reparo geralmente realizado pela célula é a anexação de um pedaço de membrana proveniente de uma vesícula para fechar o poro, chamado de selamento da membrana.

Acredita-se que a distância entre os fosfolípidos seja um parâmetro determinante para a evolução de um poro hidrofóbico para um poro hidrofílico (Weaver & Chizmadzhev, 1996b; Neu & Krassowska, 1999) e a energia livre das moléculas tem uma influência direta na área efetiva que essas moléculas ocupam (Lewis, 2003). Modelos de simulação da dinâmica molecular mostram que o evento que dispara a formação de um poro hidrofílico é a passagem de um fio de água pela membrana (Tieleman, 2004; Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008; Levine & Vernier, 2010). Um evento importante para a formação de um poro hidrofílico parece ser a movimentação da cabeça dipolar em direção ao interior da membrana (Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008; Bennett, Sapay, & Tieleman, 2014). Esta

movimentação pode ser facilitada por um melhor alinhamento das cabeças dipolares de uma monocamada com E (Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008) em conjunto com ondulações peristálticas (Bingham & Olmsted, 2010). Outros fatores que podem contribuir para a formação de poros hidrofílicos são a espessura da membrana (Bennett, Sapay, & Tieleman, 2014), a presença de íons nos meios (Leontiadou, Mark, & Marrink, 2007) e diferenças de concentração de íons entre os meios (DeBruin & Krassowska, 1999b; Gurtovenko & Vattulainen, 2005; Gurtovenko & Vattulainen, 2007; Delemotte & Tarek, 2012). A maioria das simulações considera membranas puramente constituídas por fosfolípides, porém existe uma quantidade considerável de proteínas nas membranas. A presença delas parece elevar o limiar para eletroporação (Troiano, Stebe, Raphael, & Tung, 1999; Tarek, 2005).

Lewis, 2003, propõe um modelo para explicar a influência de um E sobre a membrana, levando em conta as características das moléculas fosfolípides. A Figura 1.5 A ilustra as interações entre dois fosfolípides. Lewis argumenta que a interação hidrofóbica das caudas apolares nas regiões mais próximas da interface com a água (região amarela na Figura 1.5 A) induz uma forte associação entre os fosfolípides que impede a entrada de moléculas de água no interior da membrana. Por outro lado, a natureza dipolar das cabeças dos fosfolípides voltadas para a interface com a água induz uma força de repulsão entre elas. Ao mesmo tempo, uma força repulsiva mais fraca existe entre as cadeias apolares. O balanço dessas forças determina a área efetiva (a) ocupada pela molécula voltada para a interface com a água.

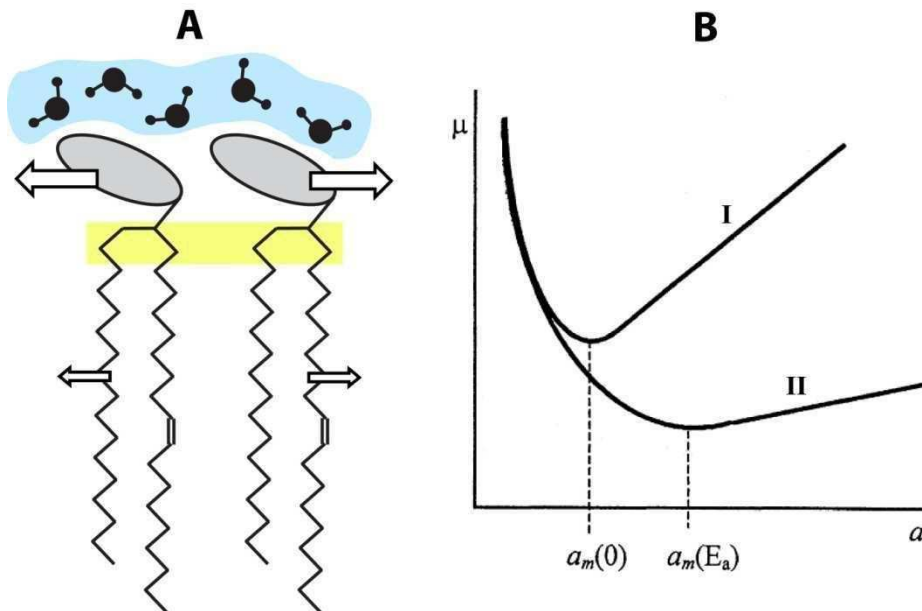


Figura 1.5: A. Ilustração da interação entre dois fosfolípides na membrana. B. Energia livre média de uma molécula de fosfolípide (μ) pela área efetiva da molécula (a). Curva I representa a relação na ausência de campo elétrico externo. Curva II representa a relação na presença de um campo elétrico através da membrana de intensidade E_a . $a_m(0)$ e $a_m(E_a)$ são os pontos de equilíbrio com mínima energia (modificado de Lewis, © 2003 IEEE).

A Figura 1.5 B mostra como a presença de \mathbf{E} altera o ponto de equilíbrio do sistema. Ela mostra um gráfico da energia livre média de um fosfolípide (μ) em função da área efetiva a . A curva I corresponde à situação onde não há \mathbf{E} externo e mostra a área efetiva para energia mínima: $a_m(0)$. A curva II ilustra a mesma relação, mas na presença de $\mathbf{E} = E_a$ e uma área efetiva $a_m(E_a)$ maior para o novo ponto de energia mínima. O aumento da área efetiva tenderia a deixar os fosfolípides mais afastados entre si, diminuindo a barreira para a entrada de moléculas de água no interior da membrana.

A eletroporação prejudica a permeabilidade seletiva da membrana, o que causa a sua despolarização e refratariedade elétrica. Assim, células, antes excitáveis, deixam de responder aos estímulos (Yabe, Smith, Daubert, Wolf, Rollins, & Ideker, 1990; Li, Jones, Yee, & Klein, 1991; Krauthamer & Jones, 1997; Sharma, Susil, & Tung, 2005). Este efeito no coração pode ser tanto pró-arrítmico quanto anti-arrítmico (Nikolski & Efimov, 2005). De qualquer forma, miócitos podem sofrer lesão irreversível pela aplicação de \mathbf{E} de alta intensidade (Oliveira, Bassani, & Bassani, 2008b). Acredita-se que a lesão se deva principalmente ao aumento do influxo de íons Ca^{2+} através dos poros não seletivos formados na eletroporação (Tung, Tovar, Neunlist, Jain, & O'Neill, 1994; Fast, Cheek, Pollard, & Ideker, 2004), causando sobrecarga de Ca^{2+} que leva à

hipercontratura celular (Donck, Pauwels, Vandeplassche, & Borgers, 1986). A Figura 1.6 ilustra, de maneira hiperbólica, a eletroporação em um miócito cardíaco e o influxo suplementar de Ca^{2+} resultante.

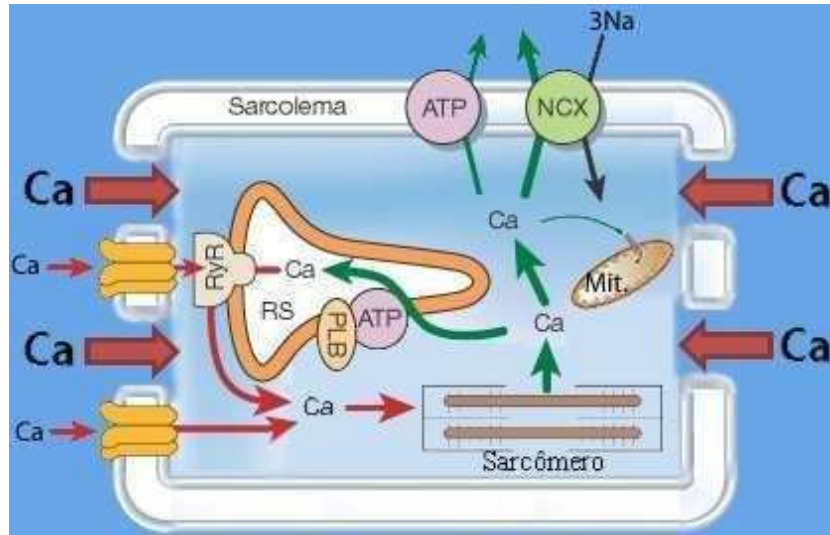


Figura 1.6: Ilustração de influxo extra de Ca^{2+} num miócito cardíaco por poros no sarcolema (modificado de Bers D. M., 2002, licença número 3411451288922).

Por outro lado, o aumento local de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é necessário para o mecanismo de selamento, pois trata-se de um processo de excitose ativado pela entrada de Ca^{2+} (Bi, Alderton, & Steinhardt, 1995; Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, & Walter, 2008). Ele também parece aumentar o tempo de criação de poros e diminuir o tempo de destruição dos mesmos (Levine & Vernier, 2010). Portanto, ao mesmo tempo em que o influxo de Ca^{2+} dispara a citólise, ele também é necessário para o reparo dos poros abertos pela eletroporação.

Em suma, temos dois efeitos antagônicos no procedimento desfibrilatório:

1. A aplicação de **E** de alta intensidade facilita a eletroporação, que tem efeitos tanto pro- e anti-arrítmicos;
2. O aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode tanto ser lesivo, causando hipercontratura, quanto benéfico, auxiliando no selamento da membrana.

Por isso, entender a dinâmica do Ca^{2+} intracelular, em especial a resposta a **E** de alta intensidade, é um pilar para o aprimoramento das técnicas existentes de reanimação e estimulação do tecido cardíaco, bem como para a elaboração de novas técnicas que causem a mínima lesão possível ao indivíduo.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve os seguintes objetivos:

- a) Desenvolver instrumentação para medição de fluorescência relacionada à concentração de Ca^{2+} citosólico em miócitos cardíacos de ratos;
- b) Implementar um método para a análise das imagens de fluorescência geradas;
- c) Realizar a comparação das variações locais da fluorescência associada à concentração de Ca^{2+} , após aplicação de um pulso de campo elétrico de alta intensidade sobre miócitos com eixo principal orientado longitudinalmente e transversalmente à direção de **E**.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

As células utilizadas foram provenientes de coração de ratos *Wistar* machos adultos (4-7 meses), vindos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB/UNICAMP). Os ratos foram criados em gaiolas coletivas em regime de iluminação 12:12 horas. Durante este período, eles receberam água e ração *ad libitum*. Os animais não foram manipulados experimentalmente até o dia da realização dos experimentos.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP (protocolo: 2587-1 (s) - vide Anexo B).

3.2 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Todas as soluções fisiológicas usadas estão descritas a seguir. As concentrações estão indicadas após cada componente. As soluções foram preparadas com água do tipo I e sais de padrão analítico. Utilizamos como indicador de fluorescência o Fluo-3 porque ele requer uma instrumentação mais simples do que indicadores ratiométricos, além de fornecer excelente contraste (Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000). Exceto quando indicado, os fármacos foram adquiridos da SigmaChem. Co., St. Louis, MO, EUA.

- Solução de Tyrode normal (NT, mM): NaCl 140, KCl 6, MgCl₂.6H₂O 1.5, Hepes 5, glicose 11.1, CaCl₂.2H₂O 1.
- Solução estoque de Fluo-3: 1 mM de Fluo-3 AM (acetoximetil-éster, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).
- Solução de Tyrode para Isolamento de Células (TyCI): composição igual a NT, exceto por ter CaCl₂ substituído por MgCl₂ e conter 10 mM HEPES.

- Solução Krebs-Henseleit para Isolamento de Células (mM): NaCl 115; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 2,4; glicose 11,1.
- Solução Cardioplégica (Cpl-P, mM): KH₂PO₄ 10; KCl 30; MgCl₂ 1; taurina 20; glicose 11; HEPES 10; ácido glutâmico 70; pH 7,4 a 23° C ajustado com KOH (usada para dissociação e armazenamento das células).
- Solução Fluo-3 para incubação de miócitos (NT-Fluo): 10 µl da solução estoque de Fluo-3 adicionados a 10 µl de solução 2% (v/v em DMSO) de Pluronic (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e 980 µl de NT para obter solução fluo-3 a 10 µM. Pluronic é um agente dispersante que facilita a difusão do Fluo-3 no meio aquoso.

3.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS

Os miócitos foram isolados por digestão enzimática do coração, conforme descrito em (Penna & Bassani, 2010). Resumidamente, o coração foi perfundido a 37°C em sistema de Langendorff com a solução de Krebs-Henseleit por 5 min. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,5 mg/ml de colagenase tipo 1 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA) por 15-20 min. Procedeu-se então à perfusão com solução TyCI contendo albumina sérica bovina (0,5 mg/ml) por cerca de 10 min. O tecido ventricular esquerdo foi delicadamente triturado em solução Cpl-P, para dissociação das células. A mesma solução foi usada para lavagem e armazenamento das células a 4°C.

3.4 INSTRUMENTAÇÃO

A Figura 3.1 ilustra a montagem experimental, composta por uma câmara de perfusão, um bloco de estimulação e um sistema de microfluorimetria.

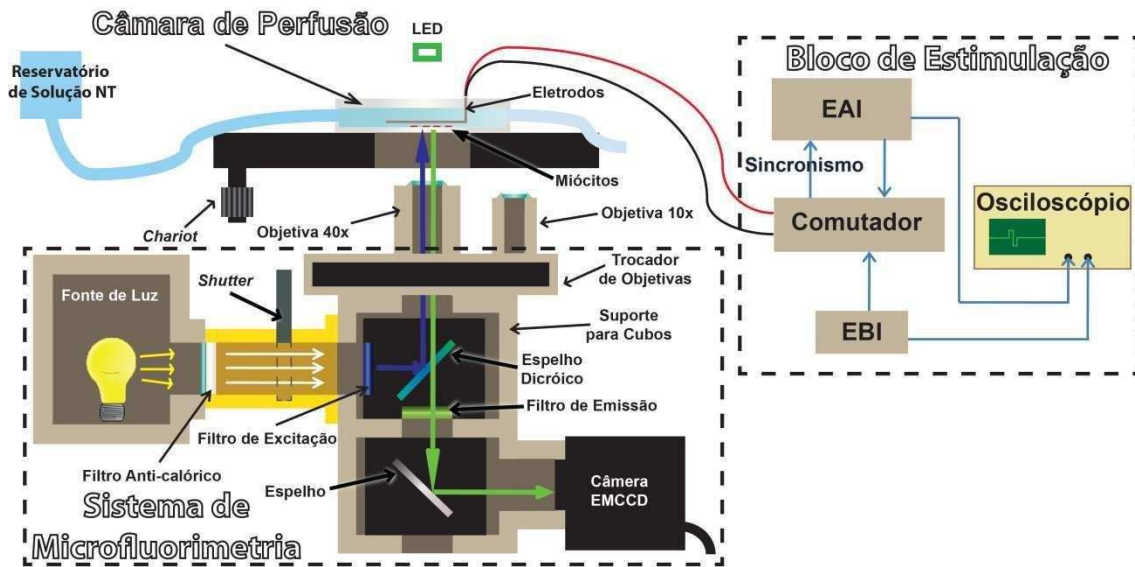


Figura 3.1: Montagem experimental: câmara de perfusão; sistema de microfluorimetria; bloco de estimulação.

3.4.1 Câmara de Perfusão

As células foram depositadas em uma câmara de perfusão desenvolvida no CEB/UNICAMP e baseada na projetada por Gomes, 1997 (Figura 3.2). Esta câmara, construída em acrílico transparente, possibilita a perfusão dos miócitos com fluxo em regime laminar. Logo após a entrada (parte superior direita, Figura 3.2) existe um cata bolhas que evita que bolhas de ar entrem na parte da câmara onde estão as células. Em ambas as laterais, ao longo de sua extensão na parte inferior, existem cavidades para a fixação de eletrodos. A colocação de dois eletrodos de platina ao longo das laterais da câmara possibilita uma distribuição uniforme do E no seu interior, quando uma diferença de tensão é estabelecida entre eles, permitindo aproximar o arranjo ao de um capacitor de placas paralelas (Jones, Lepeschkin, Jones, & Rush, 1978; Gomes, Bassani, & Bassani, 2001; Oliveira P. X., 2004). O E é dado pela expressão 2.1:

$$E = V/d \quad [2.1]$$

onde V é a diferença de potencial e d a distância entre os eletrodos. Há um degrau entre o compartimento onde estão os miócitos e a saída da câmara (parte inferior esquerda, Figura 3.2) que evita que a câmara seque se o fluxo de saída de solução for maior do que o de entrada.

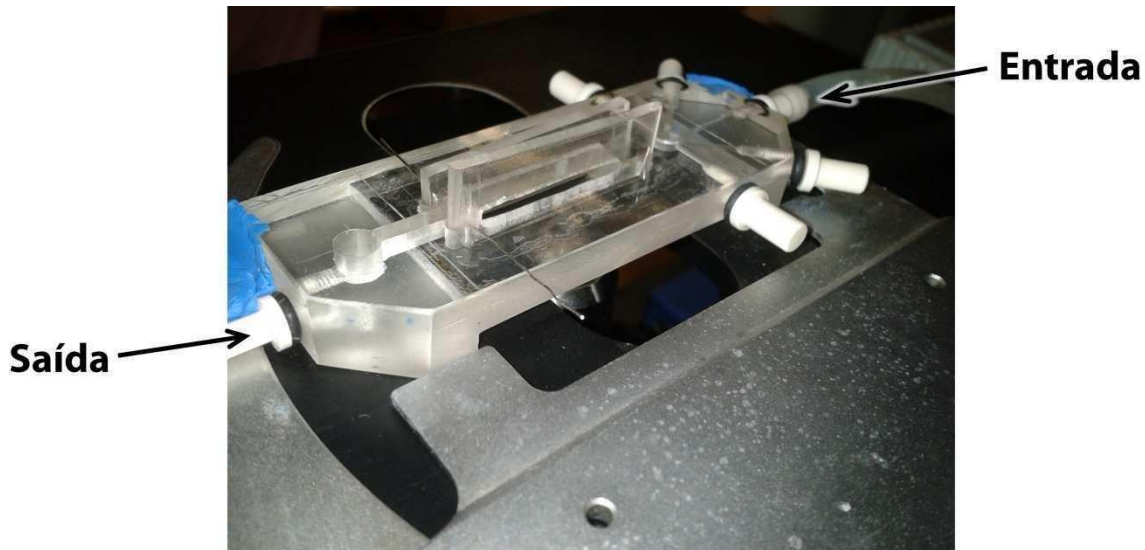


Figura 3.2: Câmara de perfusão sobre o *chariot* do microscópio.

A câmara fica apoiada em uma plataforma deslizante, ou *chariot* (Figura 3.2), movimentada manualmente e os miócitos são perfundidos com solução NT proveniente de um reservatório (seringa de 50mL).

3.4.2 Bloco de Estimulação

O bloco de estimulação é composto por um estimulador de baixa intensidade (EBI, desenvolvido no CEB/UNICAMP), que fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares simétricos; 0-15 V; 0,1-10 Hz; 0,1-10 ms de duração), um estimulador de alta intensidade (EAI, desenvolvido no CEB/UNICAMP, patente registrada sob o n° MU8500794-3, (Moura, Soares, Bassani, & Bassani, 2004)), que também fornece pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares simétricos; 0-150 V; 0,1-10 Hz; 0,1-10 ms de duração), uma chave comutadora manual (desenvolvido no CEB/UNICAMP), a qual mantém o sincronismo do EAI com o EBI e permite selecionar qual estimulador fornecerá o pulso à câmara de perfusão, e um osciloscópio digital (OSC, mod. DSO3062A, Agilent Technologies Inc., Pequim, China).

3.4.3 Sistema de Microfluorimetria

Neste sistema, a luz produzida pela lâmpada da fonte de luz (Figura 3.1) atravessa o filtro anti-calórico. Quando o *shutter* é aberto, a luz atinge o filtro de excitação, parte de um conjunto de filtros ópticos para fluorescência, que deixa passar somente a luz em um comprimento de onda (luz azul). A luz é refletida em direção aos miócitos pelo espelho dicróico fixado num ângulo de 45° (em relação ao plano da mesa) dentro de um cubo óptico. A luz é absorvida quando o indicador de fluorescência Fluo-3 está carregado nos miócitos e ligado a Ca^{2+} . Nesse caso, as moléculas de Fluo-3 sofrem um re-balanceamento energético de elétrons e, após um curto período de relaxamento, passam a emitir luz com comprimento de onda na faixa do verde, o que permite rastrear íons Ca^{2+} . A imagem do miócito produzida por essa emissão é ampliada por uma lente objetiva acoplada a um trocador de lentes. A imagem atinge o espelho dicróico e o atravessa, passando pelo filtro de emissão, posicionado na parte de baixo do cubo óptico. A imagem é refletida, por um espelho de alumínio orientado a 45° (135° em relação ao plano da mesa), e projetada no sensor EMCCD da câmera fixada na lateral.

3.4.3.1 Fonte de Luz, filtro anti-calórico e shutter

Adaptamos uma fonte de luz (Zeiss Halogen 100W), baseada em lâmpada halógena 100W (3600 lm, mod. HLX-A150-15, OSRAM, Munique, Alemanha), ao sistema de microfluorimetria. A Figura 3.3 mostra o desenho da caixa da lâmpada com seus componentes. A caixa abriga a lâmpada, um espelho refletor, uma lente coletora e um difusor. O espelho serve para direcionar a luz emitida na direção oposta e concatená-la com a luz emitida na saída. A lente coletora tem a função de alinhar os feixes de luz e o difusor serve para evitar a projeção do filamento de tungstênio sobre a célula. A parte de cima apresenta fendas em diagonal para refrigeração natural do sistema por convecção do ar.

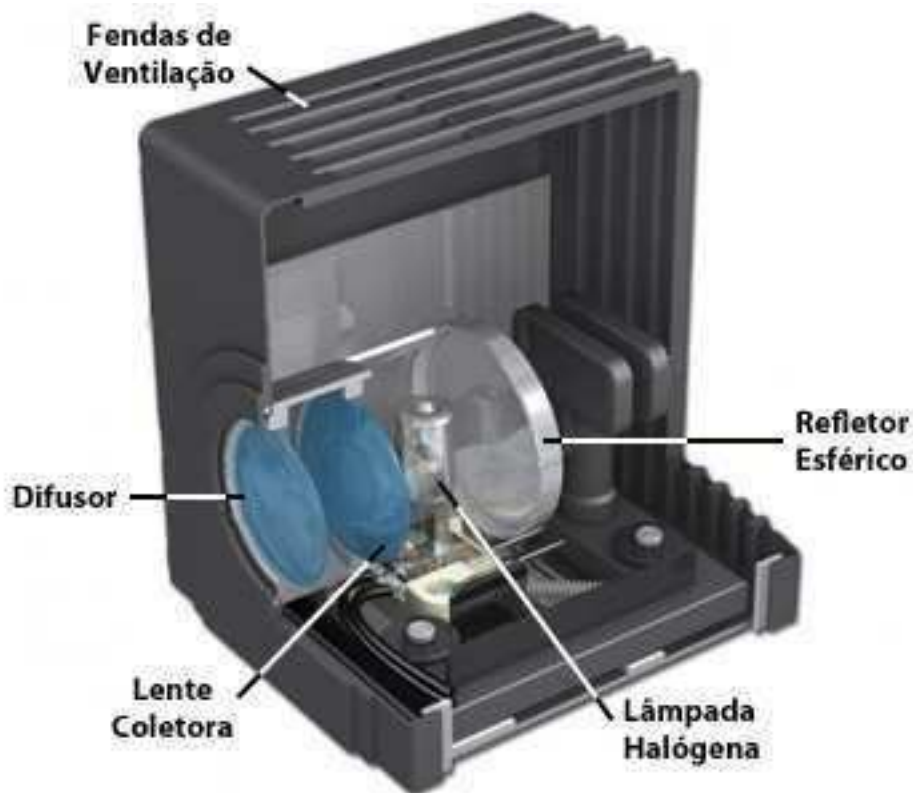


Figura 3.3: Desenho da caixa da lâmpada halógena (modificado de Zeiss, 2014).

As lâmpadas de tungstênio-halógenas fornecem uma distribuição contínua da luz dentro do espectro visível (Zeiss, 2014) e apresentam baixa emissão nos comprimentos de onda do ultravioleta. Além disso, o espectro de emissão varia com a temperatura do filamento de tungstênio. Durante operação, a temperatura pode variar de 2500°C a 3000°C , esta última corresponde a uma temperatura de cor de 3080K (Zeiss, 2014). A Figura 3.4 mostra o espectro de emissão da lâmpada para duas temperaturas de cor. Nota-se um aumento do fluxo radiante na região dos comprimentos de onda visíveis quando a temperatura é maior e, ao mesmo tempo, uma diminuição para a região do infravermelho.

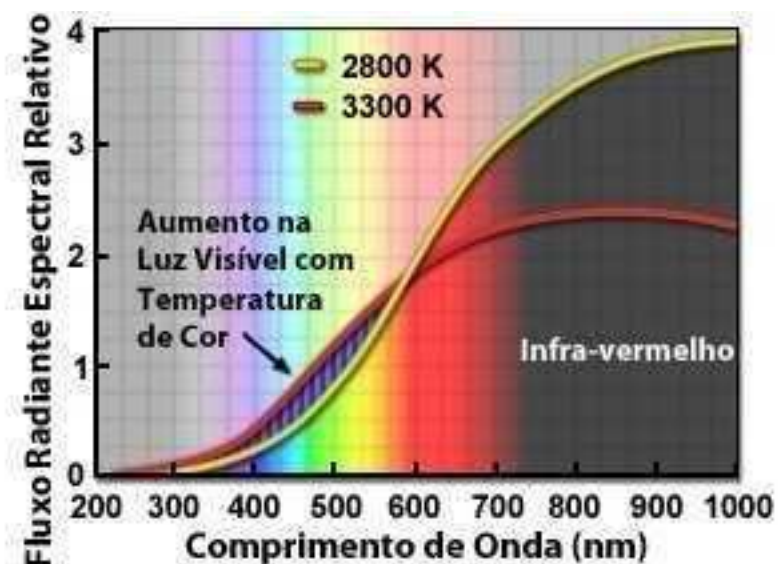


Figura 3.4: Espectro de emissão de lâmpada halógena (modificado de Zeiss, 2014).

Mesmo assim, a maior parte da energia emitida por estas lâmpadas é dissipada como calor nos comprimentos de onda infra-vermelho, desta forma, a introdução de um filtro anti-calórico é fundamental para amenizar danos calóricos aos filtros ópticos.

O filtro utilizado para absorver as radiações infra-vermelhas foi o filtro anti-calórico SCHOTT modelo KG1 (SCHOTT North America, Inc., Elmsford, NY, Estados Unidos). A Figura 3.5 apresenta seu espectro de transmissão.

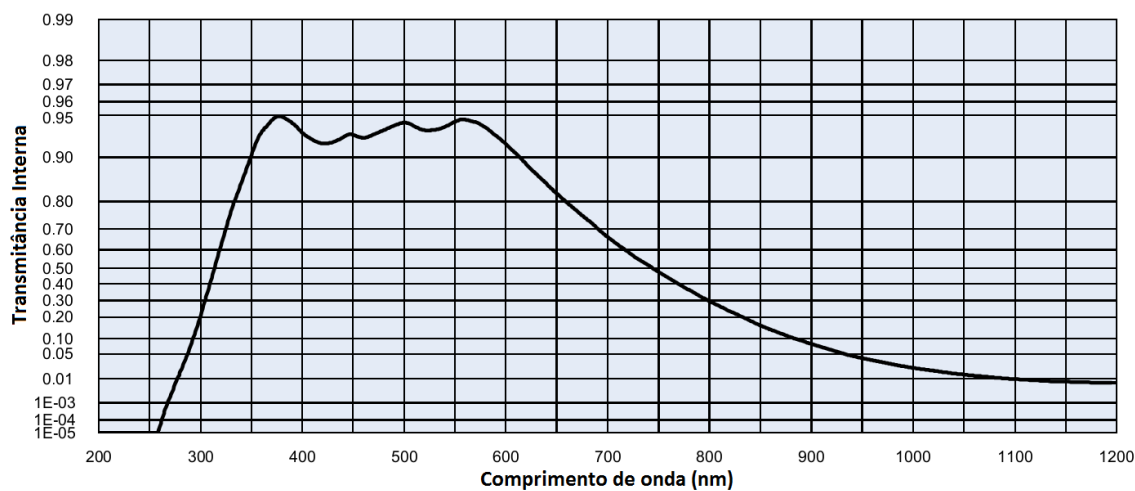


Figura 3.5: Espectro de transmissão do filtro anti-calórico SCHOTT KG1.

Ele tem como característica absorver luz com comprimento de onda na faixa do infravermelho ($>700\text{nm}$) e em boa parte do ultra-violeta ($<300\text{nm}$) enquanto transmite a luz visível ($>91\%$ para verde e azul).

O *shutter* colocado após a saída da fonte de luz permite manter a fonte de luz ligada até que a temperatura da lâmpada se estabilize sem que a luz chegue à amostra, minimizando o desbotamento do indicador de fluorescência.

3.4.3.2 Filtros Ópticos e Suporte para Cubos Ópticos

O conjunto de filtros ópticos para fluorescência é destinado a indicadores de fluorescência como Alexa 488, FITC, Fluo-3, Fluoresceína, entre outros (*Filter Set 46 HE*, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Ele é constituído de um filtro de excitação (500nm com banda de 25nm), um espelho dicróico (515nm) e um filtro de emissão (535nm com banda de 35nm). A Figura 3.6 mostra os espectros de transmitância dos filtros supracitados (vermelho, cinza e azul, respectivamente) e também os espectros de eficiência de excitação (curva laranja) e emissão (curva verde) do indicador de fluorescência associada ao Ca^{2+} , Fluo-3.

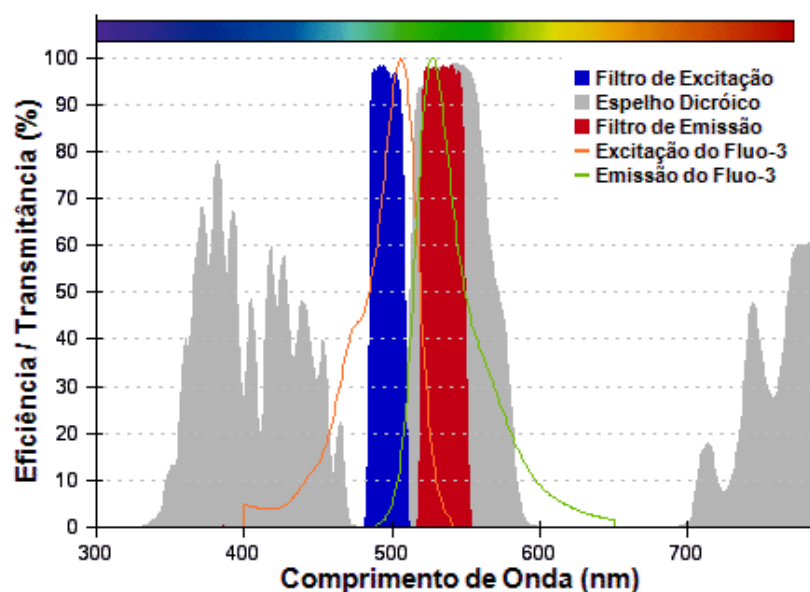


Figura 3.6: Características do conjunto de filtros ópticos Zeiss (46 HE): transmitância de filtro de excitação em azul, espelho dicróico em cinza e filtro de emissão em vermelho; eficiência de excitação do Fluo-3 em laranja e de emissão do Fluo-3 em verde (modificado de Zeiss, 2014b).

O conjunto de filtros foi inserido num cubo para filtros ópticos (módulo refletor FL) apresentado na Figura 3.7.

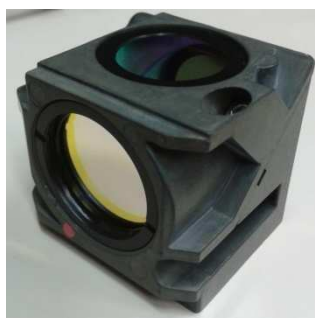


Figura 3.7: Cubo para filtros ópticos.

Em outro cubo, foi inserido um espelho de alumínio primeira superfície num ângulo de 45° . Os dois cubos ópticos foram acoplados num suporte para cubos na parte central do sistema. Esse suporte foi projetado para que os cubos ficassem fixos e perfeitamente alinhados com a lente objetiva.

3.4.3.3 Trocador de Lentes Objetivas e LED

O trocador de lentes foi introduzido no sistema para intercambiar as lentes objetivas de 10x (10/0.22 160/-, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e de 40x (FL 40/1.30 160/0.17, Leica, Wetzlar, Alemanha) com praticidade. A objetiva de 10x proporciona um campo de visão mais amplo da câmara de perfusão e é usada numa etapa de seleção de uma célula de interesse. A objetiva de 40x focaliza e amplia a célula de interesse, aumentando a resolução espacial ainda que restrinja o campo de visão.

O LED é necessário para se observar as células na etapa de seleção da célula de interesse. Foi utilizado um LED RGB porque a possibilidade de poder trocar rapidamente a faixa de comprimentos de onda emitida entre azul, verde e vermelho se mostrou vantajosa, pois torna o sistema versátil, ou seja, permite que se possa utilizar alguns outros conjuntos de filtros sem grandes modificações físicas no sistema. Além disso, quando a emissão do LED é feita no verde, pode-se visualizar os miócitos sem que seja necessário retirar o cubo com o conjunto de filtros de fluorescência já que a faixa de passagem do filtro de emissão condiz com a emissão do LED.

3.4.3.4 Câmera com sensor EMCCD

Neste trabalho, buscamos fazer o registro de fluorescência à maior taxa de aquisição possível para quantificar com boa precisão os transientes locais relacionados a $[Ca^{2+}]_i$. Portanto, escolhemos uma câmera mostrada na Figura 3.8 (mod Ixon-3, Andor Technology, Belfast, Reino Unido) com sensor EMCCD (*Electron Multiplying Charged Coupled Device*). A câmera dispõe de várias características de interesse para este trabalho como um sensor com 512x512 pixels, *binning* de 1x1, 2x2 e 4x4, eficiência quântica (conversão de fóton para elétron) em torno de 90% para toda faixa de comprimentos de onda do espectro visível, ganho EM (*Electron Multiplying*) de até 1000x e frequência de leitura de pixel de 10MHz. A taxa de aquisição de imagens depende das configurações da câmera, tais como *binning*, tamanho da região utilizada do sensor (por exemplo, utilizar uma janela diminui o número de pixels utilizados e pode aumentar a taxa de aquisição) e especialmente o tempo de exposição.



Figura 3.8: Câmera com sensor EMCCD.

As imagens são enviadas para o sistema de aquisição de dados, que é composto por um computador (processador Intel Core i7, 3,06 GHz, 8 GB RAM, 1,5 TB e 2TB de HD) com o respectivo software da câmera (Andor iQ2 2.7).

3.4.3.5 Bancada de Trabalho Escura

Experimentos com fluorescência geralmente requerem um ambiente escuro, pois a luz ambiente pode penetrar no sistema e introduzir ruído nas imagens de fluorescência. Portanto, desenvolvemos um suporte com hastes de metal que envolve todo o sistema. Ele tem dois propósitos: bloquear luz externa sobre o sistema e amortecer vibrações externas que por ventura possam perturbar o registro das imagens.

O suporte, cujo desenho com o sistema de microfluorimetria é mostrado na Figura 3.9, consiste de uma base contendo uma plataforma anti-vibração (pedra de mármore colocada sobre cinco câmaras de ar), 4 hastes de aço que ligam os cantos da base ao topo do suporte, onde são inter-conectadas por outras hastes e uma cortina de tecido corta-luz envolvendo todo o suporte (não mostrada na Figura 3.9). Na parte frontal, é possível abrir a cortina ao soltar zíperes nas laterais.

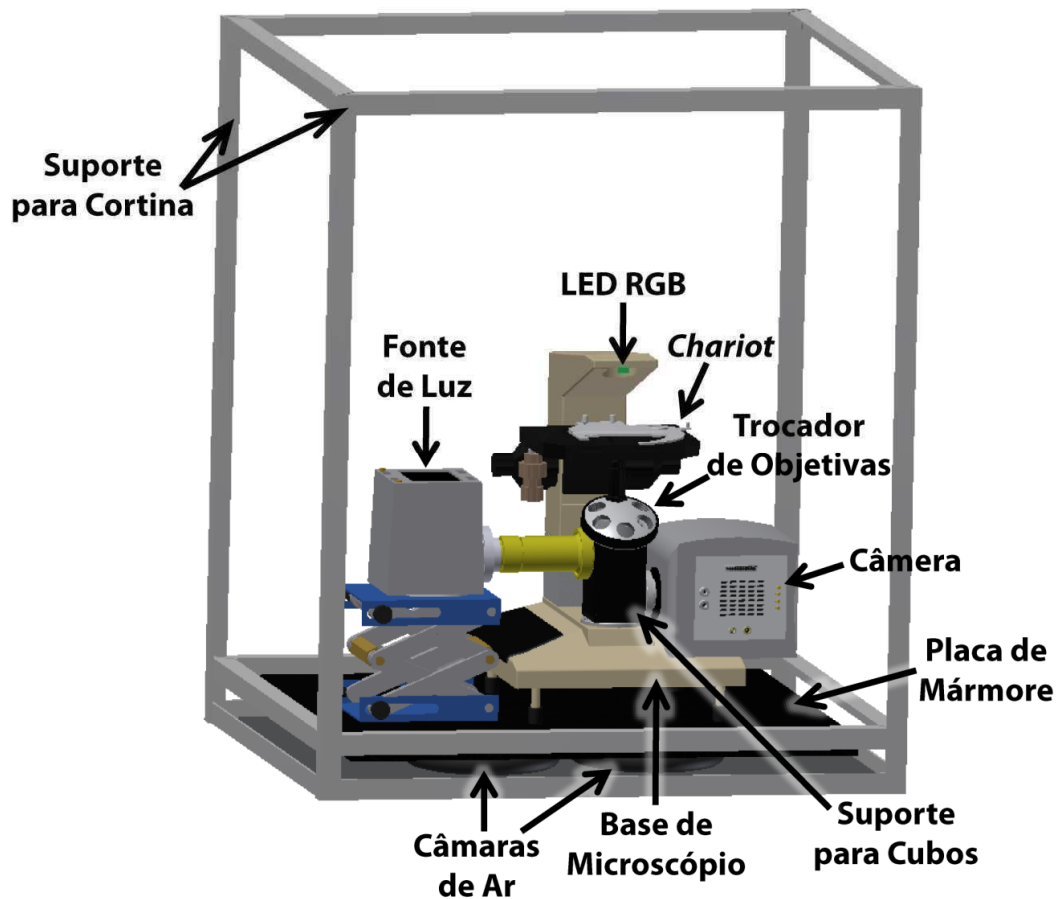


Figura 3.9: Desenho da bancada de trabalho escura (sem cortina) com o sistema de microfluorimetria.

3.5 SOFTWARE DE ANÁLISE

Um *software* específico para analisar os vídeos de fluorescência foi desenvolvido em MATLAB (versão 7.8.0.347 - Estados Unidos). O programa processa os vídeos e realiza, ao mesmo tempo, dois tipos diferentes de análise comparativa local da fluorescência: numa delas, ele calcula e compara as médias de fluorescência normalizada em regiões de interesse (*Regions of Interest* - ROIs) e, em outra, ele calcula áreas cujo aumento de fluorescência ultrapassou um certo limiar, nessas mesmas ROIs. A Figura 3.10 mostra um fluxograma simplificado do *software*.

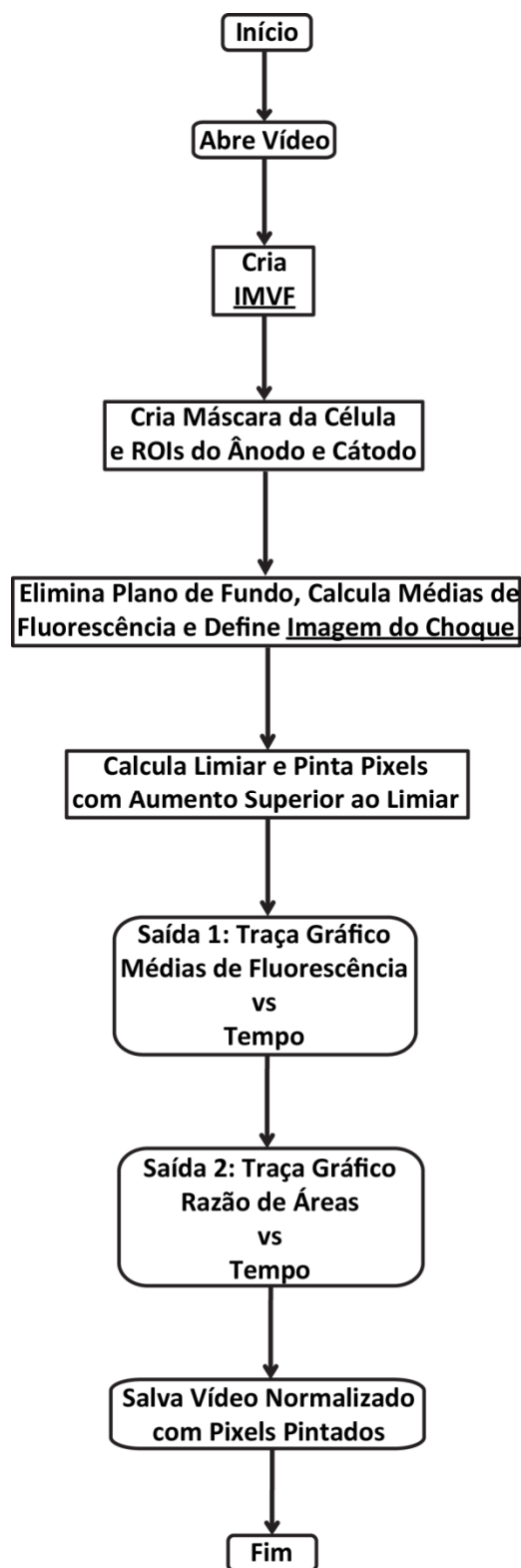


Figura 3.10: Fluxograma simplificado do *software* de análise de vídeos de fluorescência. IMVF: Imagem Média da Variação de Fluorescência em resposta a estímulos de baixa intensidade. Imagem do Choque: imagem no pico de fluorescência pós-choque.

O *software* dispõe de uma interface gráfica e processa o vídeo seguindo uma série de comandos do usuário. Numa etapa preliminar à execução do *software* desenvolvido, aplica-se um filtro gaussiano com raio de 1 pixel sobre o vídeo de fluorescência por meio do *software* ImageJ (versão 1.47b - Estados Unidos) para atenuação de ruído e redução do efeito de artefato de movimento. Em seguida, inicia-se o *software* desenvolvido. Sua primeira etapa é selecionar e abrir o vídeo em questão. Este é então apresentado na tela principal juntamente com um gráfico de sua média de fluorescência pelo tempo. O gráfico, em todos os experimentos, possui um traçado típico: uma linha de base com alguns picos a cada 2 segundos (estimulação a 0,5Hz). A Figura 3.11 mostra um gráfico de exemplo com este traçado.

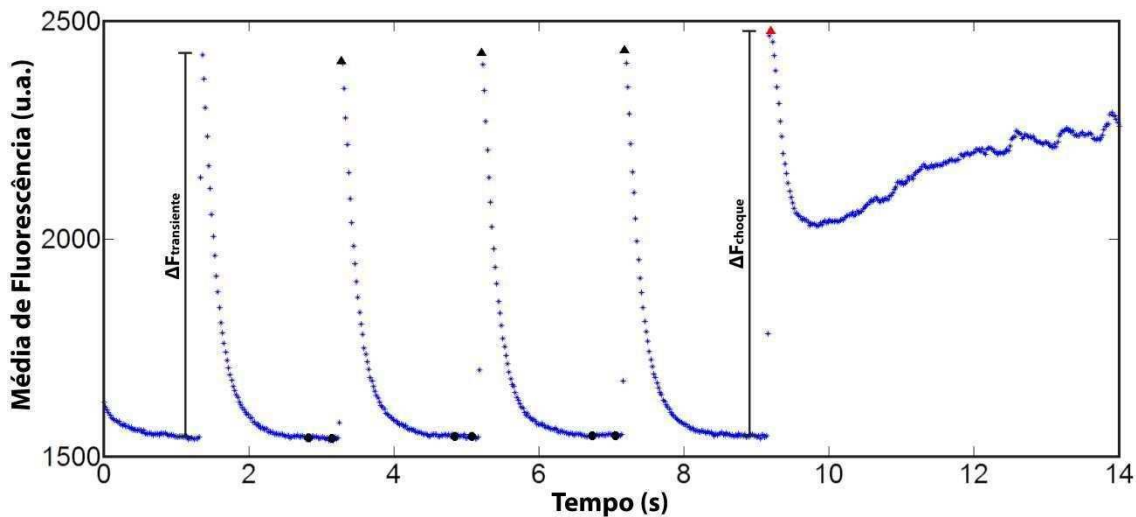


Figura 3.11: Gráfico da média de fluorescência pelo tempo. $\Delta F_{\text{transiente}}$: variação de fluorescência em resposta a estímulo de baixa intensidade. ΔF_{choque} : variação de fluorescência em resposta a estímulo de alta intensidade.

O valor basal corresponde à fluorescência da célula durante o repouso. Os picos de fluorescência são evocados pela aplicação dos estímulos elétricos de baixa intensidade ou pelo estímulo de alta intensidade (choque), o qual é facilmente identificável, pois é sempre maior que os demais e altera drasticamente o valor de base após sua aplicação. A variação de fluorescência entre o repouso e o pico de fluorescência evocado por um estímulo de baixa intensidade é aqui denominada $\Delta F_{\text{transiente}}$. A variação entre o repouso e o pico de fluorescência evocado por estímulo de alta intensidade é denominada variação de fluorescência pós-choque (ΔF_{choque}).

O primeiro passo da etapa de processamento consiste em obter uma imagem média padronizada que corresponda a $\Delta F_{\text{transiente}}$, chamada Imagem Média da Variação de Fluorescência

(IMVF). Esta imagem serve como base para o cálculo de máscaras sobre o vídeo e também participa do cálculo do limiar de fluorescência. A Figura 3.12 é um detalhamento da caixa "Cria IMVF" da Figura 3.10 e apresenta o fluxograma específico que define as ações do programa nesta etapa. Algumas imagens de exemplo acompanham os fluxogramas específicos que seguem.

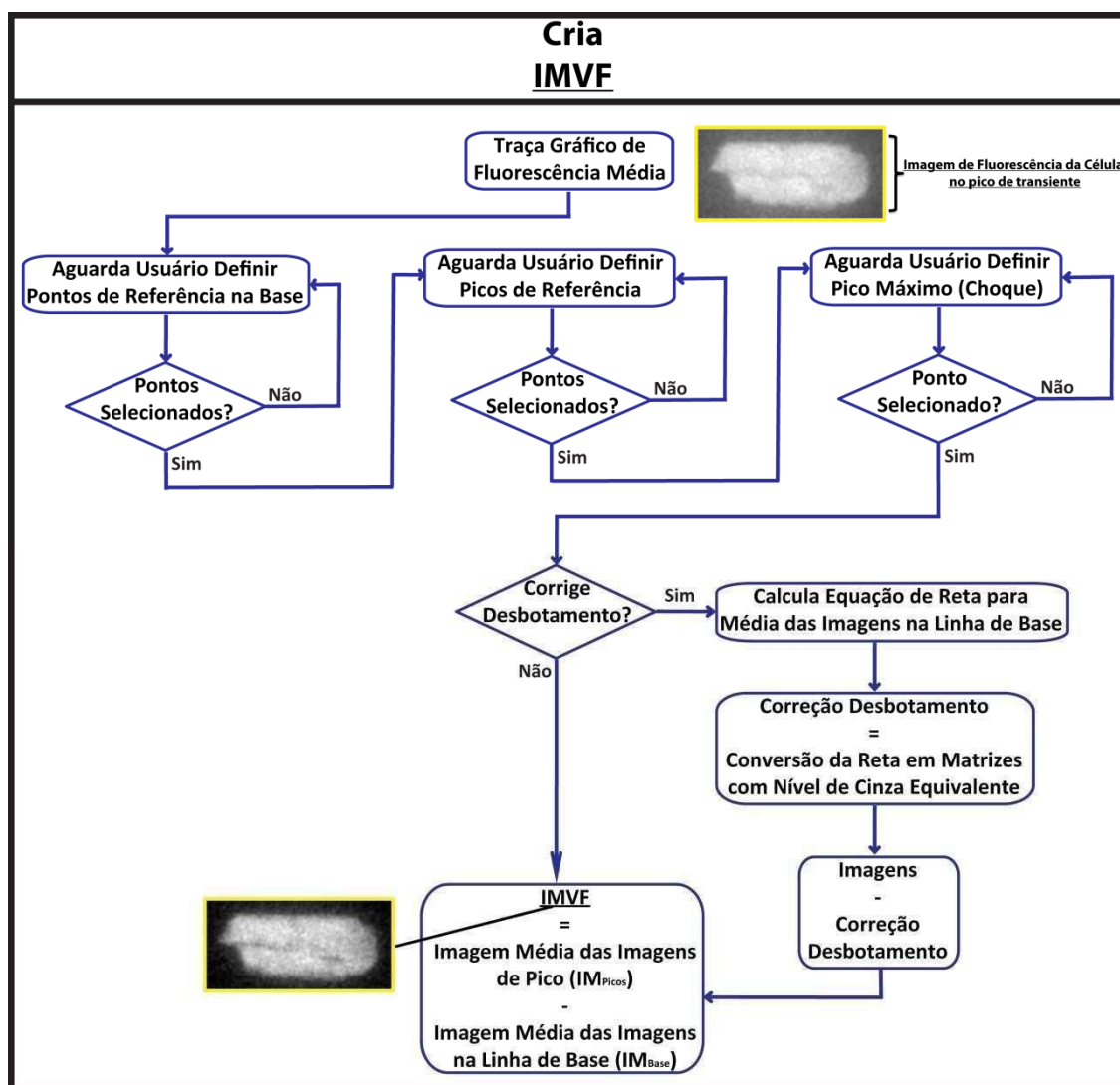


Figura 3.12: Fluxograma do Bloco "Cria IMVF".

No topo da Figura 3.12 existe uma imagem de fluorescência de uma célula no pico de fluorescência induzido por um estímulo de baixa intensidade antes de qualquer processamento do programa. Esta imagem é uma amostra do vídeo que o programa recebe como entrada. Após traçado o gráfico da fluorescência global da célula com relação ao tempo (Figura 3.11), o

programa aguarda que o usuário defina três intervalos quando a célula está em repouso (círculos pretos na linha de base do gráfico, Figura 3.11), três picos de fluorescência evocado por estímulo de baixa intensidade seguintes a cada intervalo (picos de $\Delta F_{\text{transiente}}$, ou seja, triângulos pretos na Figura 3.11) e, por fim, aguarda o ponto do pico em resposta ao estímulo de alta intensidade (pico de ΔF_{choque} , ilustrado por triângulo vermelho na Figura 3.11). Estes pontos, que correspondem a imagens no vídeo, serão usados para obter algumas imagens médias. Vale lembrar aqui que a média dos valores de pixels de uma imagem resulta num escalar enquanto que a média de uma série de imagens resulta numa imagem (ou matriz) média. Deste modo, o programa produz uma imagem média a partir da média do valor de cada pixel entre as imagens dos intervalos selecionados na linha de base (IM_{Base}) e uma outra imagem média construída a partir da média do valor de cada pixel das imagens dos picos de $\Delta F_{\text{transiente}}$ (IM_{Picos}).

Dependendo do tempo em que a célula foi exposta à luz antes do registro em vídeo, o indicador de fluorescência pode sofrer desbotamento. Isto também pode ser identificado no gráfico da média de fluorescência por uma leve e constante queda da linha de base ao longo do tempo (queda ausente na Figura 3.11). Apesar do decaimento de fluorescência de um indicador de fluorescência ter um comportamento exponencial (Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000), aproximamos o decaimento para uma reta visto que o tempo de aquisição de imagens foi curto e o resultado foi muito satisfatório. Portanto, o programa oferece a possibilidade de correção do desbotamento, subtraindo este deslocamento decrescente das imagens. A Figura 3.13 mostra um exemplo de gráfico com desbotamento.

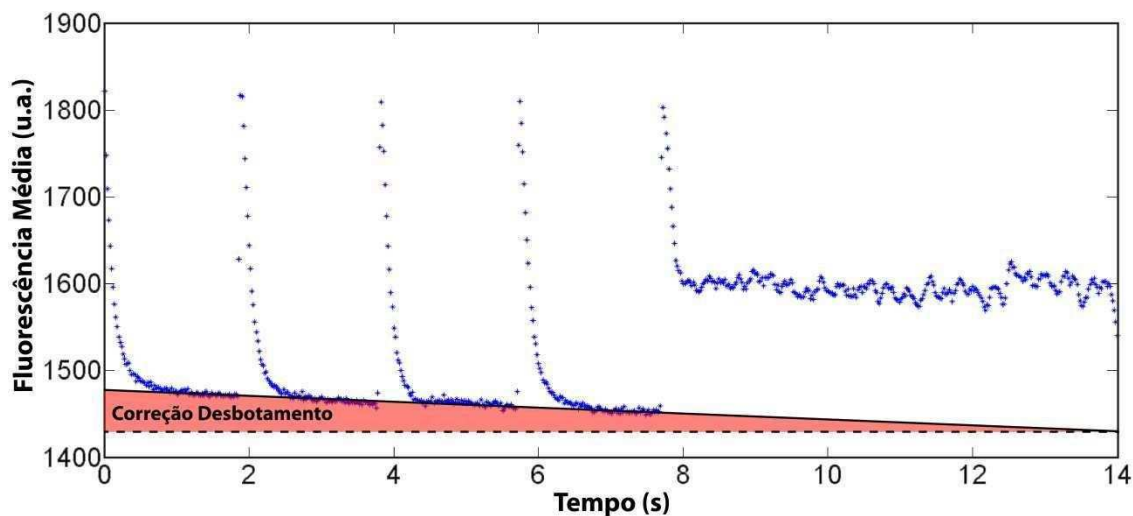


Figura 3.13: Gráfico exemplo da média de fluorescência pelo tempo com decaimento da linha de base (desbotamento).

O programa calcula uma equação de reta para os pontos dentro dos intervalos selecionados pelo usuário na linha de base do gráfico de fluorescência média (região entre círculos pretos na Figura 3.11) pelo método dos quadrados mínimos, o que resulta numa reta com coeficiente angular negativo, mostrada na Figura 3.13. Em seguida, cria uma série de matrizes correspondentes a cada *frame* do vídeo. Dentro de cada matriz, ele atribui o mesmo valor a todos os seus pixels. Este valor é exatamente a variação entre a linha pontilhada e a reta decrescente da Figura 3.13 para cada *frame*. Caso se queira correção de desbotamento, essas matrizes de correção de desbotamento são subtraídas de seus respectivos *frames*, fazendo com que a IM_{Base} e a IM_{Picos} sejam geradas somente após essa consideração. A $IMVF$ é fabricada pela subtração da IM_{Picos} pela IM_{Base} (Figura 3.12). Caso não seja necessária correção de desbotamento, a $IMVF$ é gerada da mesma forma, porém sem a etapa de subtração de matrizes de correção de desbotamento. Um exemplo de uma $IMVF$ é mostrado na parte inferior da Figura 3.12.

Com a $IMVF$ criada, a próxima etapa é a criação de máscaras e ROIs, como indicado na Figura 3.10. Aqui, entende-se por máscara a região delimitada por um contorno numa imagem binária (preto ou branco) enquanto uma ROI é o resultado da aplicação desta máscara sobre uma imagem com níveis de cinza (16bits). A etapa "Cria Máscara da Célula e ROIs do Ânodo e Cátodo" é melhor caracterizada na Figura 3.14. O programa transforma a $IMVF$ em uma imagem binária, usando como valor de corte a média de fluorescência de seus pixels. Em seguida, aplica um processo de fechamento usando como elemento estrutural um quadrado com lado de 3 pixels.

O fechamento preenche buracos no interior da máscara e suaviza as bordas. A máscara da célula fica como o exemplo na Figura 3.14, onde pixels com valor nulo são mostrados em preto e pixels com valor unitário são brancos. Uma multiplicação pixel a pixel da máscara pelas imagens anula a região de fundo enquanto preserva os valores dos pixels que representam a fluorescência da célula. Portanto, ela serve para excluir o plano de fundo, garantindo que as medidas serão feitas apenas para a fluorescência no interior da célula. O resultado é como uma ROI da célula inteira. Cria-se um contorno da célula aplicando-se o método de Canny (Canny, 1986) sobre a máscara. Uma imagem do contorno também é mostrada na Figura 3.14.

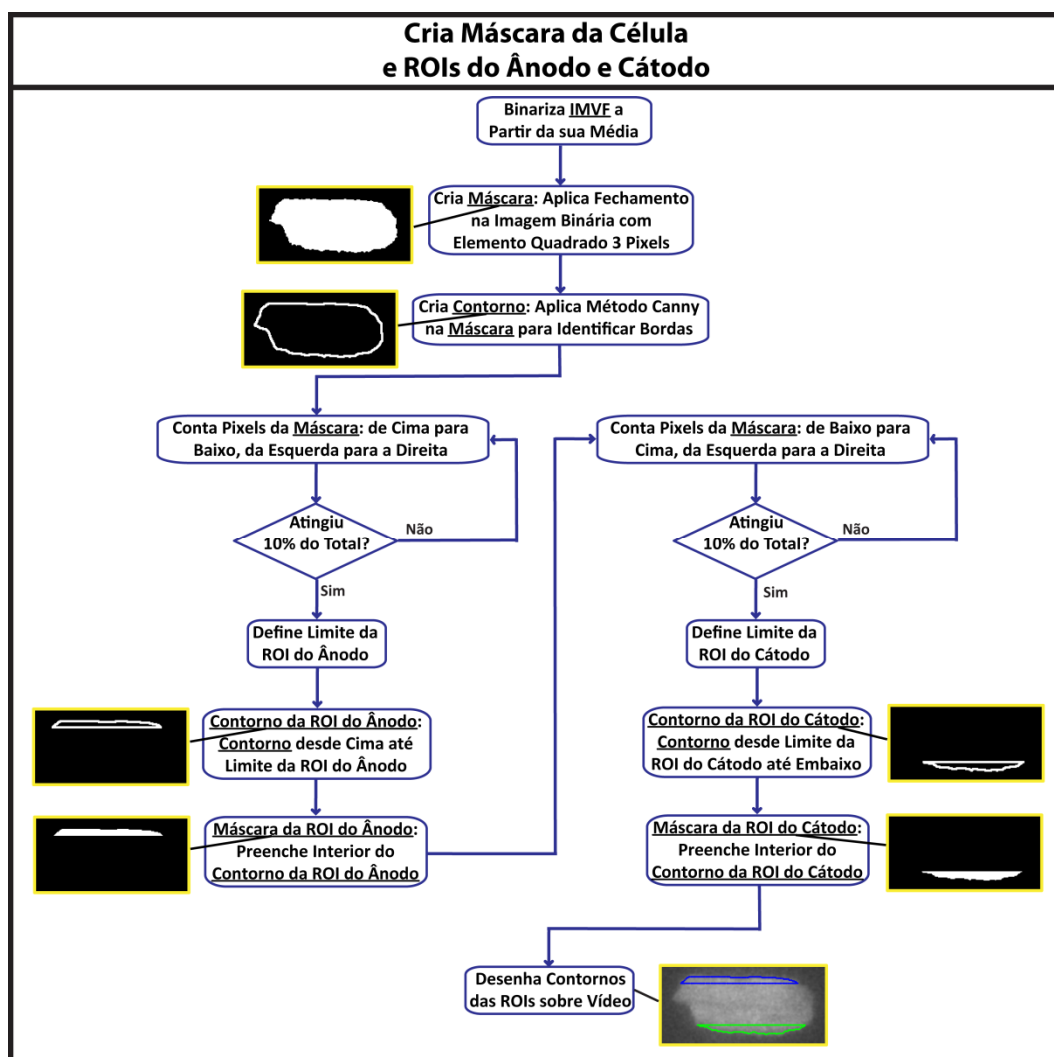


Figura 3.14: Fluxograma do Bloco "Cria Máscara da Célula e ROIs do Ânodo e Cátodo".

Agora o programa determina as ROIs do ânodo e do cátodo, isto é, as suas máscaras e contornos. Foram geradas áreas nas extremidades da célula que correspondem, cada uma, a 10% da área total. Esta porcentagem pode ser alterada pelo usuário, no entanto, a escolhemos como tal porque visualmente ela se mostrou grande o suficiente para englobar toda a extensão de membrana da célula voltada para cada eletrodo (em ambas as orientações) ao mesmo tempo em que não invadia o centro da célula. Pela máscara da célula, sabe-se o número total de pixels que representa a célula, portanto o programa conta os pixels a partir de cada extremidade até atingir 10% do total. A linha que contiver o pixel que completa os 10% é definida como o limite da ROI em construção. Desta forma, junto com o contorno da célula, define-se o contorno de uma ROI por meio da conexão da linha do limite da ROI com o contorno da extremidade mais próxima. As máscaras das ROIs são criadas preenchendo-se o interior de cada contorno com valores unitários. Essas máscaras permitem quantificar somente os pixels contidos nas ROIs e são mostradas na Figura 3.14, bem como seus contornos, os quais servem para apresentar ao usuário o resultado obtido (imagem inferior da Figura 3.14).

Continuando a sequência da Figura 3.10, o próximo bloco contém a eliminação do plano de fundo. O fluxograma detalhado deste bloco corresponde à Figura 3.15. Inicialmente o *software* percorre o vídeo e vai padronizando cada imagem para que o vídeo resulte em variações que partam aproximadamente de zero. Isto é, ele subtrai de cada *frame* a IM_{Base} e, caso se deseje corrigir desbotamento, também subtrai a matriz de correção de desbotamento correspondente. De qualquer forma, ele gera as imagens que representam apenas variações de fluorescência, pois retira o *offset* de fluorescência no repouso. Por exemplo, imagens de momentos em que a célula está em repouso se tornam *frames* escuros, pois estes *frames* são praticamente iguais à IM_{Base} , enquanto que nos *frames* durante os transientes e pós choque é possível ver claramente a fluorescência da célula.

O programa cria cada ROI aplicando as respectivas máscaras sobre cada imagem de variação. Na sequência, ele calcula os parâmetros que aparecerão na primeira saída: as médias de fluorescência normalizadas para a célula e para cada ROI ao longo do tempo. O limite inferior da normalização do gráfico já está definido e implementado porque as imagens estão padronizadas para que os valores de seus pixels partam de aproximadamente zero. Portanto, para obter as médias normalizadas, falta estabelecer um limite superior para o gráfico. Para isso, o programa calcula a média dos valores dos pixels da IMVF para a célula e para cada ROI. Estes serão

considerados os limites superiores da normalização do gráfico de fluorescência média porque representam os máximos médios dos transientes. Por fim, as médias de fluorescência normalizadas são obtidas por meio da média dos valores dos pixels dentro de cada imagem dividida pelo limite superior (para a célula inteira e para cada ROI). Desta forma, durante os transientes, os valores do gráfico variam entre de 0 e 1. Os valores só podem superar 1 caso a célula, em algum momento, forneça uma média de fluorescência maior do que aquela da IMVF. Tal momento é evidente após aplicação do estímulo de alta intensidade.

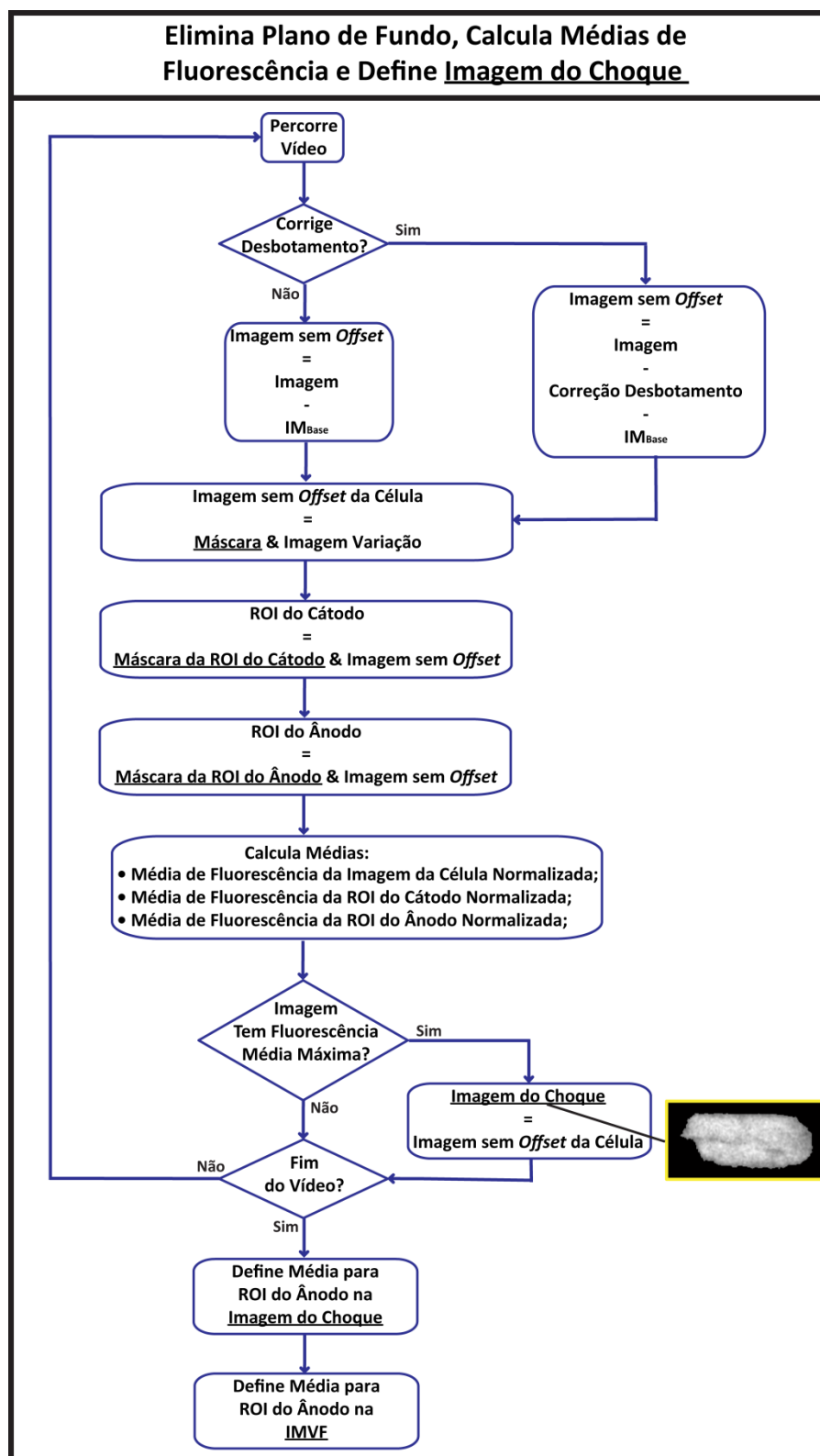


Figura 3.15: Fluxograma do Bloco "Elimina Plano de Fundo, Calcula Médias de Fluorescência e Define Imagem do Choque".

Enquanto o *software* calcula estas médias, ele busca pela imagem com a maior média de fluorescência. Ao encontrá-la, ele a define como Imagem do Choque (Figura 3.15). Ela é a imagem onde ocorre ΔF_{choque} .

Quando termina de percorrer o vídeo, o programa calcula a média de fluorescência na ROI do ânodo para a IMVF ($\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$) e para a Imagem do Choque ($\Delta F_{\text{choque_ânodo}}$). Claramente $\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$, se normalizado pela ROI do ânodo, torna-se igual à unidade, pois trata-se do próprio limite superior da normalização dessa ROI, mas aqui estamos nos referindo a valores não-normalizados. Estas definições serão fundamentais para o próximo bloco da Figura 3.10, também detalhado na Figura 3.16: "Calcula Limiar e Pinta Pixels com Aumento Superior ao Limiar".

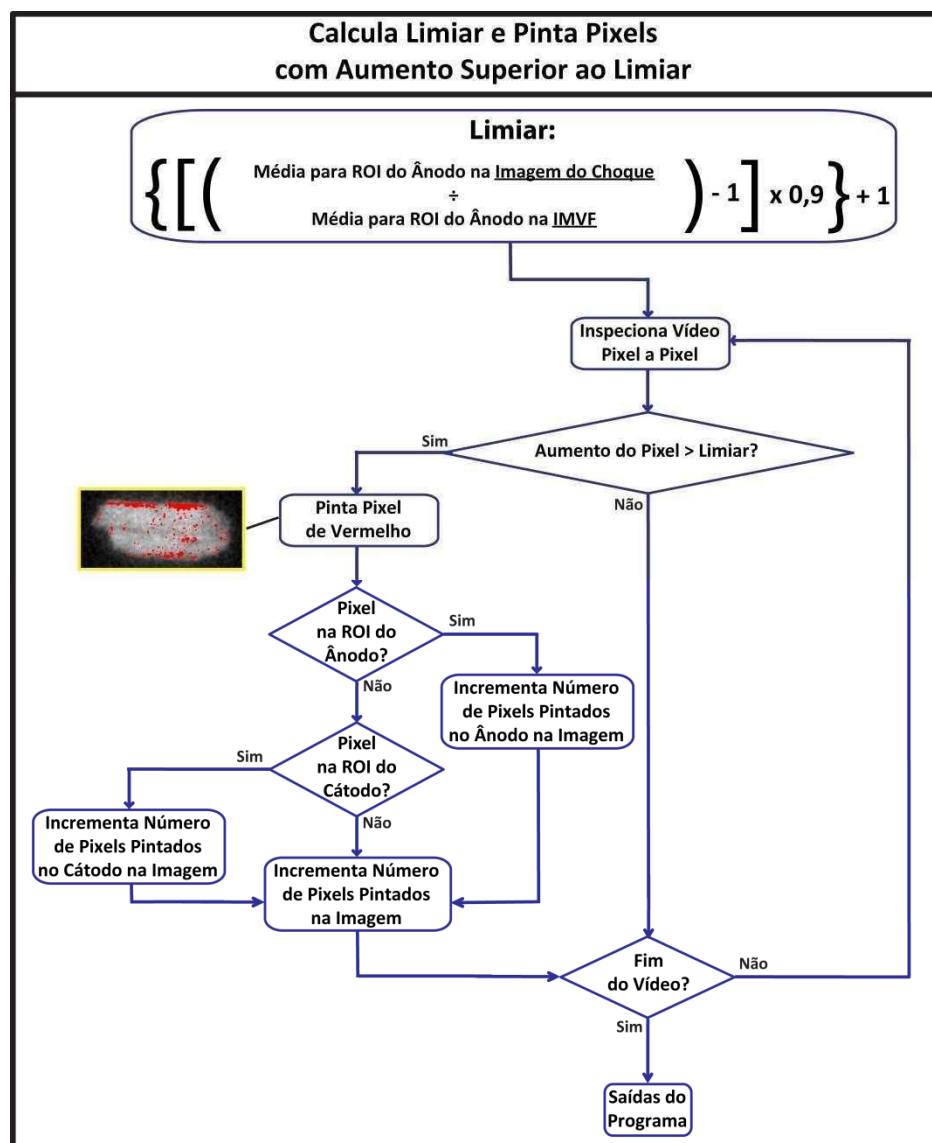


Figura 3.16: Fluxograma do Bloco "Calcula Aumento Limiar e Pinta Pixels com Aumento Superior ao Limiar".

A primeira etapa é calcular o limiar de pixel que determinará se pixels serão marcados em vermelho ou não. Este limiar deve estar pouco abaixo do máximo de fluorescência do vídeo. Por isso, seu cálculo se realiza sobre a região do ânodo, pois foi mostrado que choques monoplares causam maior eletroporação nesta região (Knisley & Grant, 1995) e, portanto, espera-se um maior aumento da concentração de cálcio nessa região, por consequência, um máximo de fluorescência logo após a aplicação do choque.

A Figura 3.17 apresenta um traçado de fluorescência média normalizada na ROI do ânodo pelo tempo. O aumento máximo de fluorescência (AMF) é a razão entre $\Delta F_{\text{choque_ânodo}}$ e $\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$, como mostra a expressão 2.2 :

$$AMF = \frac{\Delta F_{\text{choque_ânodo}}}{\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}} \quad [2.2]$$

AMF é um termo de ganho geral utilizado sobre ambas as ROIs e sobre a célula inteira, apesar de ter sido calculado sobre a ROI do ânodo. Se subtrairmos 1 de AMF, teremos apenas o aumento supra-transiente de fluorescência pós-choque. Deseja-se destacar apenas os pixels que tiveram um aumento de valor significativo, fornecendo uma noção espacial de possíveis lesões no sarcolema. Assim, o limiar foi definido como 90% apenas sobre o aumento supra-transiente, como mostra a expressão abaixo:

$$\text{Limiar} = [0,9 \times (AMF - 1)] + 1 \quad [2.3]$$

Volta-se a somar 1 depois para que o programa possa comparar adequadamente o aumento de cada pixel com o Limiar. Por exemplo, na Figura 3.17, se $AMF = 1,2$, os pixels com um aumento igual ou superior a 1,18 com relação à Imagem Transiente Padrão serão marcados em vermelho e devidamente quantificados. A título de comparação, se aplicássemos a porcentagem diretamente sobre AMF ($0,9 \times AMF$), teríamos um limiar de 1,08. Isto mostra que buscamos ser mais rigorosos no cálculo desse limiar, aproximando-o mais de AMF.

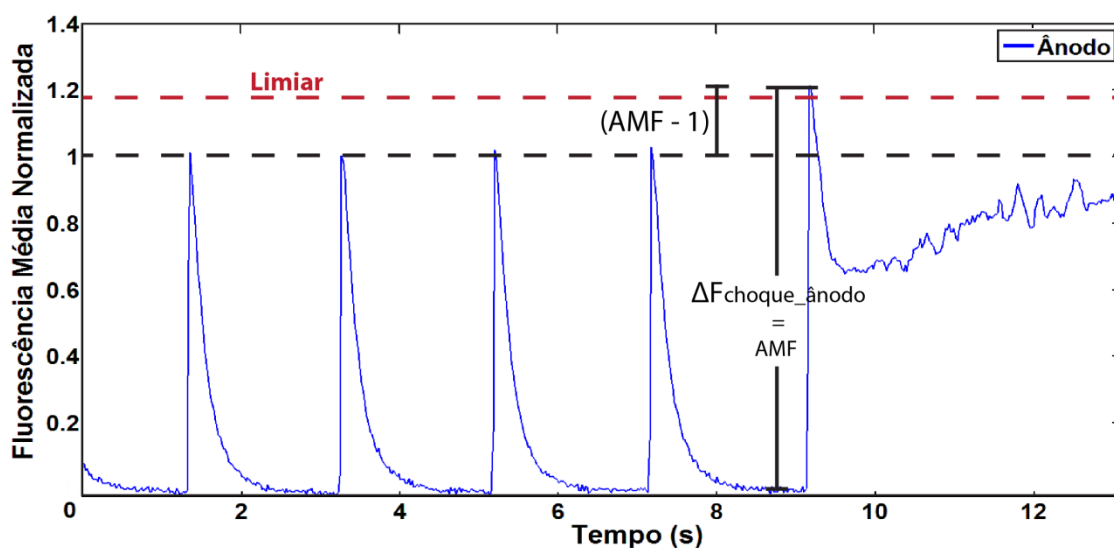


Figura 3.17: Fluorescência Média Normalizada na ROI do ânodo em função do tempo: aumento máximo de fluorescência (AMF). $\Delta F_{\text{choque_ânodo}}$ está igual a AMF neste caso porque o gráfico está normalizado pela média de fluorescência de IMOFT na ROI do ânodo, que é $\Delta F_{\text{transiente_ânodo}}$. Na ROI do cátodo e na célula inteira, essa igualdade não ocorre.

Voltando na Figura 3.16, após calcular o limiar, o programa inspeciona o vídeo, pixel a pixel, imagem a imagem, verificando se o valor normalizado do pixel é maior ou não do que o limiar. Se for maior, o programa pinta o pixel de vermelho e averigua se este pixel está contido em alguma das duas ROIs. Se estiver, o programa incrementa o número de pixels pintados naquela ROI daquele *frame*. Se não estiver, de qualquer forma ele está dentro da célula, então o programa incrementa o número de pixels pintados naquele *frame*. Isto se repete até o fim do vídeo.

Finalizando o fluxograma da Figura 3.10, o *software* traça um gráfico normalizado da fluorescência média em função do tempo para a célula inteira, ROI do cátodo e ROI do ânodo. Em seguida, traça um gráfico da razão da área em vermelho pela área total da célula, em função do tempo, também para célula inteira, ROI do cátodo e ROI do ânodo. O programa permite salvar o vídeo de variação com os pixels pintados.

3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A Figura 3.18 resume as etapas do protocolo experimental explicado a seguir.

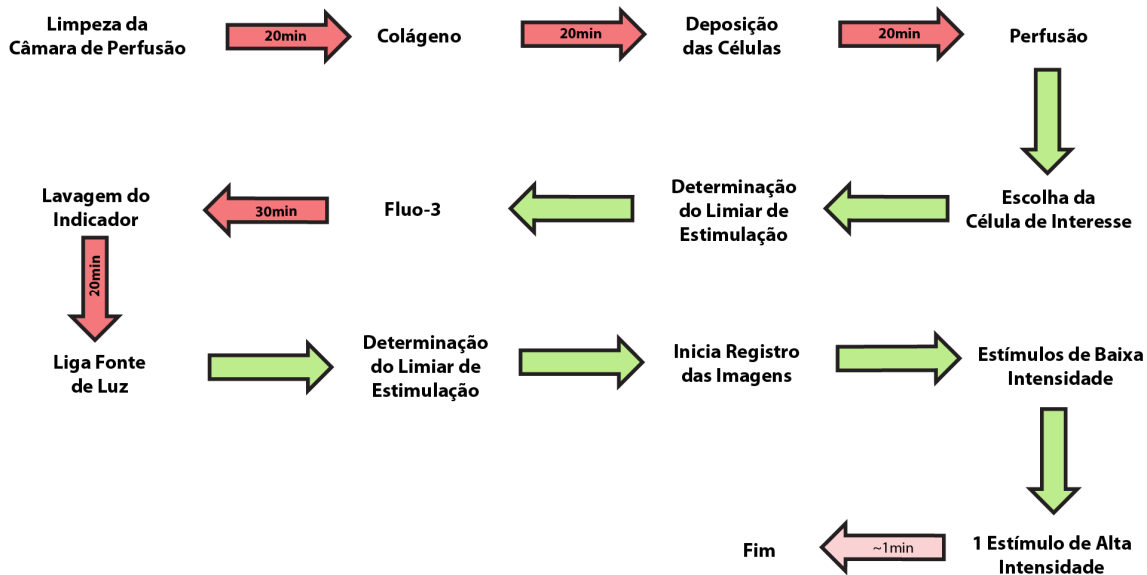


Figura 3.18: Etapas do Protocolo Experimental.

Antes de cada experimento, a câmara de perfusão e os eletrodos foram limpos com etanol 70%, lavados com água deionizada e secados por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, uma fina camada de colágeno foi aplicada na lamínula no fundo da câmara para melhorar a fixação das células. Aguardou-se novamente 20 minutos para, em seguida, adicionar os miócitos. Neste momento foram posicionados os eletrodos e mais 20 minutos foram aguardados para decantação das células no fundo da câmara. A preparação foi perfundida com solução NT com temperatura entre 23 e 25°C, à taxa de 1 a 2 ml/min. Ligou-se o LED no verde para observação dos miócitos. A etapa de escolha da célula de interesse consistiu na busca de uma célula cuja orientação de seu maior eixo fosse paralela ou perpendicular às linhas de campo elétrico. A célula também deveria ser capaz de responder aos estímulos elétricos por meio de contrações. O EBI foi configurado para gerar pulsos bipolares supra limiar de estimulação com duração total de 10ms a uma frequência de 0,5Hz. A amplitude dos pulsos do EBI foi diminuída gradativamente até

chegar ao limiar de estimulação. Ele correspondia ao valor mais baixo de tensão aplicada para o qual o miócito ainda realizava contração.

A estimulação foi desligada, o LED apagado, as cortinas fechadas e 225 μ L da solução NT-Fluo para incubação foram adicionados à câmara de modo a atingir uma concentração de cerca de 3 μ M de Fluo-3. O tempo de incubação foi de 30 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as células foram perfundidas com NT por 20 minutos para eliminar o indicador do meio extracelular (lavagem do indicador).

As células carregadas com Fluo-3 foram novamente estimuladas pelo EBI a 0,5 Hz, com estímulos bipolares de baixa potência (1,2 vezes o limiar e duração total de 10 ms) ainda com as luzes apagadas. A luz de excitação (fonte de luz) era então acesa, determinava-se novamente o limiar de estimulação e gravava-se um vídeo da fluorescência do miócito que estava sendo estimulado. Após alguns pulsos de baixa intensidade, aplicava-se um pulso de alta intensidade (cerca de 15 vezes o limiar de estimulação).

A taxa de aquisição de imagens é inversamente proporcional ao tempo de exposição. Para maximizar a taxa de aquisição, ajustamos o tempo de exposição e o ganho da câmara EMCCD, resultando num baixo tempo de exposição para um ganho elevado. Os parâmetros da câmara foram: *binning* 2x2, ganho 300x e tempo de exposição de 13ms. O *binning* 2x2 permitiu aumentar radicalmente a taxa de aquisição em comparação com o 1x1 além de melhorar o contraste a custo de perda de resolução espacial. O ganho 300x é o máximo recomendado pelo manual da câmara quando a refrigeração do sensor é feita apenas com o *cooler* da câmara. As imagens de fluorescência ainda foram janeladas num retângulo compreendendo o miócito, pois isto também resultava em ganho na taxa de aquisição já que menos pixels são transmitidos. Por isso, as taxas de aquisição não foram exatamente as mesmas em cada experimento (diferentes tamanhos de janelas). Mais, a câmara apresenta uma leitura de pixels mais rápida na horizontal do sensor do que na vertical. Com isso, as células do grupo transversal, dispostas na horizontal, apresentaram taxa de aquisição superior às do grupo vertical. A taxa de aquisição média das células do grupo transversal foi de 49,5 FPS (Frames por segundo) e a do grupo longitudinal foi de 35,55 FPS.

Os vídeos produzidos foram analisados pelo *software* de análise desenvolvido neste projeto.

3.7 CÁLCULO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRANA

A fim de se ter uma estimativa do perfil da variação de potencial transmembrana induzida pelo \mathbf{E} externo, calculamos a variação do potencial transmembrana máximo adotando o modelo do esferóide prolato proposto por Klee e Plonsey, 1976. A superfície da célula é aproximada a um esferóide descrito pela equação 2.4

$$x^2/a^2 + y^2/a^2 + z^2/c^2 = 1 \quad [2.4]$$

onde a é o comprimento do menor semi-eixo e c é o comprimento do maior semi-eixo. Considera-se uma membrana não-condutora e um campo elétrico genérico ($\vec{E} = E_{0x}\vec{x} + E_{0y}\vec{y} + E_{0z}\vec{z}$) é aplicado. De acordo com os autores, isto resulta na seguinte distribuição de potencial

$$\Delta V_m(x, y, z) \cong (E_{0x}x + E_{0y}y)A + (E_{0z}z)C \quad [2.5]$$

na qual,

$$A = \left\{ 1 - \frac{1}{2\epsilon^3} \left(\epsilon + \frac{1-\epsilon^2}{2} \ln \frac{1-\epsilon}{1+\epsilon} \right) \right\}^{-1} \quad [2.6]$$

$$C = \left\{ 1 - \frac{1}{2\epsilon^3} \left[2\epsilon(\epsilon^2 - 1) - (1 - \epsilon^2) \ln \frac{1-\epsilon}{1+\epsilon} \right] \right\}^{-1} \quad [2.7]$$

$$\epsilon = (1 - a^2/c^2)^{1/2} \quad [2.8].$$

No nosso caso, os campos elétricos foram aplicados somente na direção z ($\vec{E} = E_0\vec{z}$) para as células do grupo longitudinal e somente na direção x ($\vec{E} = E_0\vec{x}$) para as células do grupo transversal. Considerando isso na equação 2.5, temos:

$$\Delta V_m(z) = (E_0z)C \quad [2.9]$$

$$\Delta V_m(x) = (E_0x)A \quad [2.10].$$

A equação 2.9 corresponde à variação de potencial transmembrana do grupo longitudinal e a equação 2.10, do grupo transversal. Durante estímulo por campo elétrico limiar, temos $E_0 = E_T$.

As variações máximas ocorrem nas extremidades. Com isso, as equações para $\Delta V_{\text{máxT}}$, para os grupos longitudinal e transversal, são, respectivamente:

$$\Delta V_{\text{máxT}} = E_T cC \quad [2.11]$$

$$\Delta V_{\text{máxT}} = E_T aA \quad [2.12].$$

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado sobre os seguintes parâmetros de células orientadas na longitudinal e na transversal: $2c$, $2a$, E_T e $\Delta V_{\text{máxT}}$. Em seguida, teste t-Student não pareado foi aplicado para os mesmos parâmetros comparando os grupos longitudinal e transversal.

Numa primeira etapa, a fim de investigar de maneira geral as variações de fluorescência nas extremidades das células, juntou-se os grupos transversal e longitudinal e aplicou-se o teste t-Student pareado, entre ROI de ânodo e ROI do cátodo, para os parâmetros: média de fluorescência normalizada e razão de áreas.

Por fim, para uma análise que contemplasse concomitantemente tanto as regiões da célula quanto o grupo, realizou-se teste ANOVA bi-fatorial, cujos fatores foram direção de \mathbf{E} , isto é, transversal e longitudinal, e região (ânodo e cátodo). O teste foi feito sobre as duas saídas do programa: média de fluorescência e razão de áreas. Pós-teste de Bonferroni foi aplicado quando houve diferença estatística no teste ANOVA. Em todos os testes, os grupos foram considerados estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

A Figura 4.1 A é uma foto do sistema de microfluorimetria construído, com os principais elementos indicados, conforme a instrumentação apresentada na seção 3.4. A Figura 4.1 B é uma foto mais distante do sistema, mostrando a bancada de trabalho escura, o que inclui a cortina vista pelo exterior e a plataforma anti-vibração.

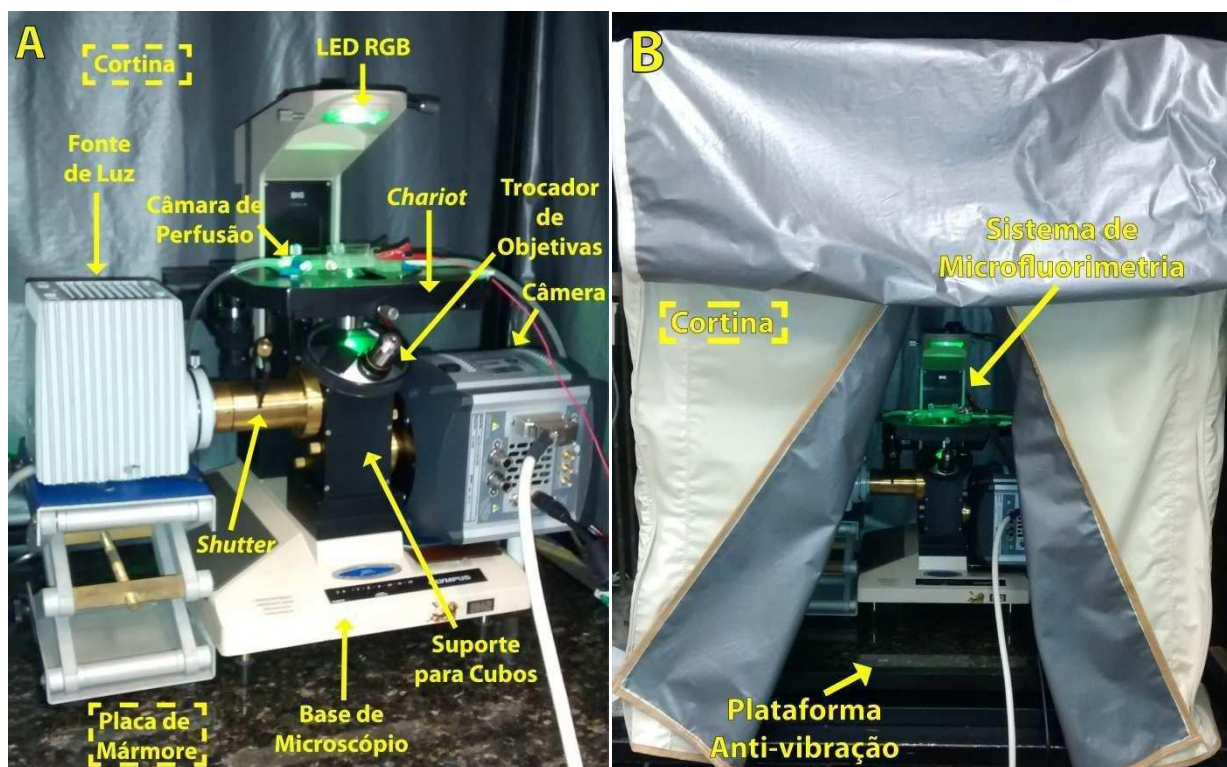


Figura 4.1: A. Foto do sistema de microfluorimetria com os principais componentes indicados. B. Foto do sistema com bancada de trabalho escura.

O conjunto com fonte de luz com lâmpada halógena, filtro anti-calórico e *shutter* foi capaz de excitar o indicador de fluorescência Fluo-3 o suficiente para que sua emissão fosse registrada pelo sensor EMCCD da câmera, sem danificar o conjunto de filtros ópticos e sem gerar efeito foto-tóxico sobre as células. Considerando as atenuações sofridas pela luz ($\lambda=500$ nm) até

atingir à câmara de perfusão, podemos observar nos gráficos de transmitância do filtro anti-calórico (Figura 3.5) e do filtro de excitação (Figura 3.6) que eles permitem a passagem de cerca de 94% e 95%, respectivamente. O espelho dicróico reflete toda a luz no comprimento de 500nm, portanto não há atenuação. A transmitância de uma objetiva 40/0.75 sem imersão, também para 500nm, é de aproximadamente 98% (Anexo - Figura A.1). Portanto, podemos estimar uma transmitância total de cerca de 87,5%.

O sucesso na obtenção das imagens de fluorescência se deveu também à correta seleção do conjunto de filtros ópticos. Veja como uma região bem próxima ao pico do espectro de excitação do Fluo-3 concorda com a faixa de passagem do filtro de excitação (Figura 3.6, curvas laranja e azul, respectivamente) ao mesmo tempo que o pico de emissão do Fluo-3 está compreendido na faixa de passagem do filtro de emissão (Figura 3.6, curvas verde e vermelha, respectivamente). Além do mais, o espectro do espelho dicróico (Figura 3.6, em cinza) reflete a faixa que o filtro de excitação deixa passar, visto que a curva cinza não concorda com a azul, enquanto possibilita a passagem nos comprimentos de onda emitidos como fluorescência, uma vez que a curva cinza compreende a curva vermelha.

O suporte para cubos ópticos produzido garantiu um preciso alinhamento dos cubos ópticos com a lente objetiva do trocador e com a câmara. Isto pôde ser observado pelas imagens capturadas pela câmara: a imagem de um miócito com a objetiva de 40x preencheu completamente o sensor da câmara e não existiram regiões com sombras causadas por bloqueios parciais do caminho óptico. Configurando a câmara com *binning* 2x2, obtivemos um tamanho de pixel de aproximadamente $0,74 \times 0,74 \mu\text{m}$. Isto corresponde a um aumento do tamanho real da célula de 242 vezes.

A base de microscópio com a bancada anti-vibração amenizaram vibrações externas, produzindo imagens com pouco artefato de movimento oriundo deste tipo de interferência.

A cortina que envolve o sistema foi capaz de bloquear completamente a iluminação ambiente. Com a cortina fechada e tanto a fonte de luz quanto o LED apagados, configuramos a câmara com o ganho EM máximo recomendado (ganho EM = 300) e ligamos as luzes da sala. As imagens capturadas pela câmara consistiram apenas de imagens homogêneas escuras e não se notou variação no histograma dessas imagens mesmo após ligarmos as luzes ambiente.

4.2 SOFTWARE DE ANÁLISE

O *software* de análise das imagens de fluorescência foi produzido com uma interface gráfica. Ela possui alguns botões e campos por onde o usuário envia comandos, e algumas regiões onde lhe são apresentados dados, gráficos e imagens. A interface inicial do programa é exibida na Figura 4.2:

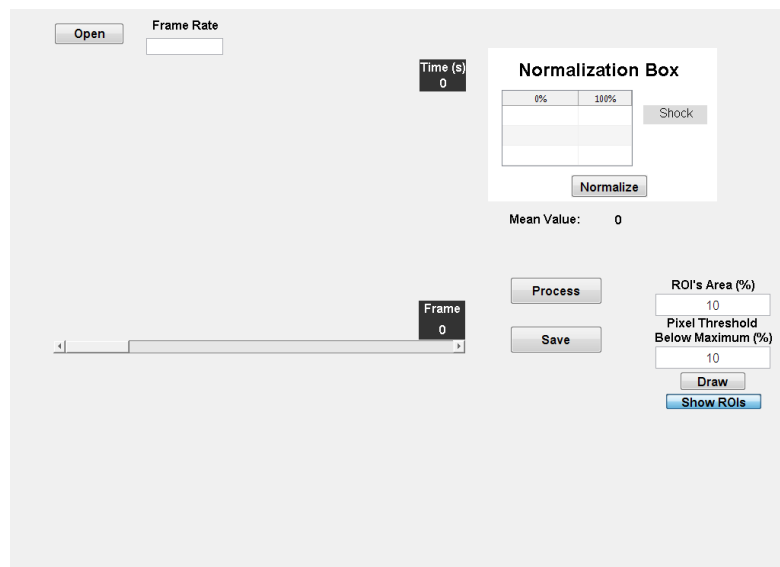


Figura 4.2: Interface inicial do *software*.

Na parte superior esquerda, há o botão *Open* para abrir o vídeo de fluorescência e o campo *Frame Rate* onde o usuário deve inserir a taxa de aquisição do vídeo. Abaixo deles existe uma região com uma barra de rolagem e as indicações *Time (s)* e *Frame*. O vídeo será exibido nessa região. Na direita, a caixa *Normalization Box* contém uma tabela (colunas *0%* e *100%*), um campo *Shock* e o botão *Normalize*. Nesta caixa serão explicitados os pontos de referência para a normalização do vídeo. Abaixo dela, o campo *Mean Value* mostra a média de fluorescência da imagem atual. Na parte inferior direita estão os campos *ROI's Area (%)* e *Pixel Threshold Below Maximum (%)*. Eles determinam, respectivamente, o tamanho das ROIs (em relação à área total) e a porcentagem abaixo do máximo de fluorescência que define o limiar para destaque de pixels em vermelho. Por fim, também na parte inferior direita da Figura 4.2, temos os botões *Process*, *Save*, *Draw* e *Show ROIs*.

A Figura 4.3 mostra um fluxograma operacional do *software*, isto é, a sequência de comandos que deve ser realizada para processar o vídeo. O usuário deve inserir a taxa de aquisição e clicar no botão *Open* para abrir um vídeo. Isto faz com que a primeira imagem do vídeo apareça na interface, assim como um gráfico abaixo dela contendo a média dos níveis de cinza de cada imagem do vídeo; os níveis de cinza correspondem às intensidades do sinal de fluorescência. A interface do programa assume a imagem mostrada na Figura 4.4. O usuário pode percorrer o vídeo através da barra de rolagem. Um ponto preto também percorre o gráfico de fluorescência acompanhando a progressão do vídeo.

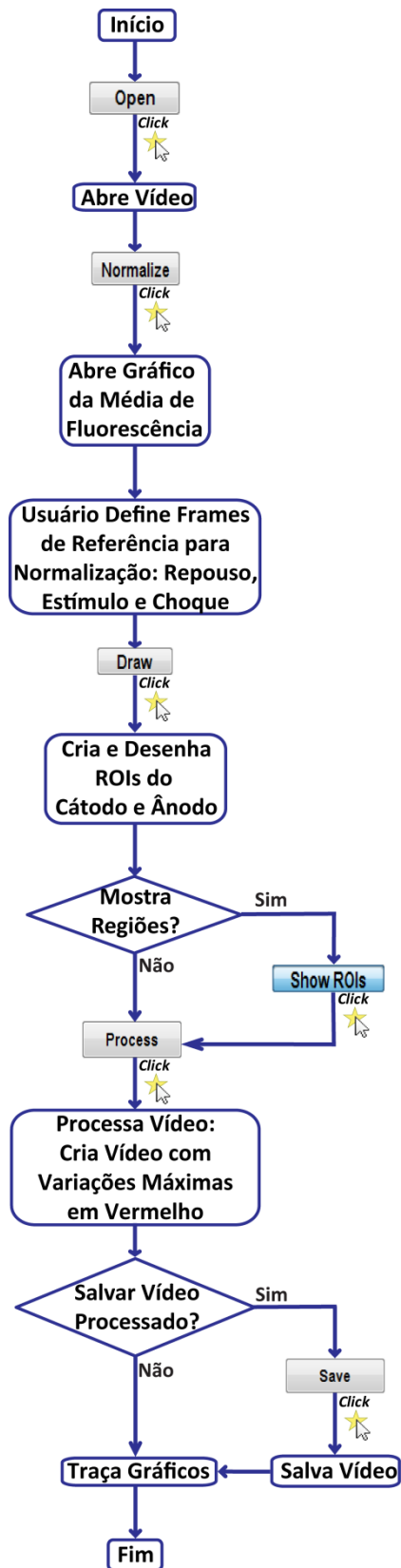


Figura 4.3: Fluxograma operacional do *software* de análise.

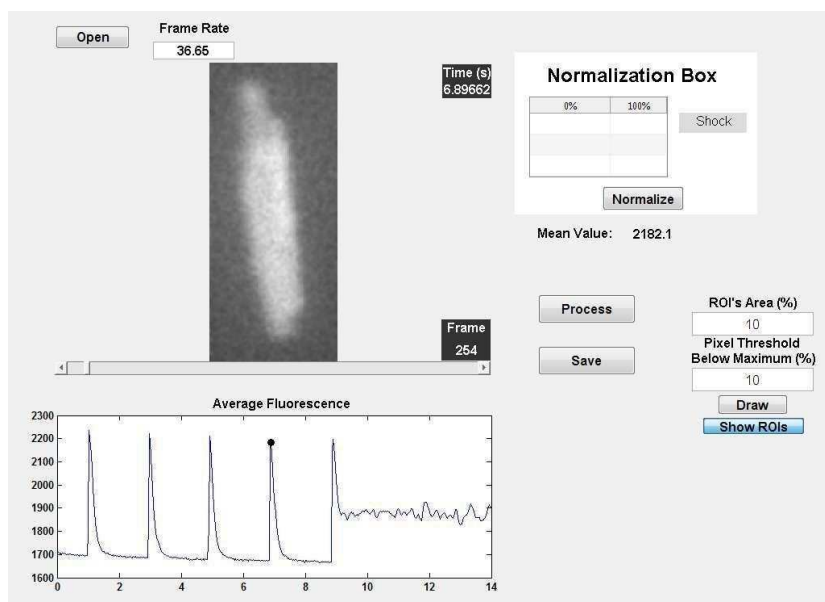


Figura 4.4: Interface do *software* após abertura de vídeo.

Em seguida, o botão *Normalize* em *Normalization Box* expande o gráfico de fluorescência média numa outra janela (Figura 3.11). Neste instante, a opção de corrigir desbotamento é oferecida ao usuário. No gráfico, cabe ao usuário selecionar alguns intervalos quando a célula está em repouso, quando a célula responde aos estímulos de baixa intensidade e após a aplicação do choque. Depois desta seleção, a janela com o gráfico expandido se fecha e os campos contidos na caixa *Normalization Box* são preenchidos com os valores dos *frames* que o usuário selecionou no gráfico. A coluna *0%* mostra os intervalos de *frames* correspondentes aos intervalos selecionados na linha de base (*frames* contidos entre os círculos pretos da Figura 3.11). A coluna *100%* apresenta os números dos *frames* dos picos dos transientes (equivalentes aos triângulos pretos da Figura 3.11). Por fim, o campo *Shock* exibe o número do *frame* com máxima fluorescência pós-choque (corresponde ao triângulo vermelho da Figura 3.11).

Acionar o botão *Draw* faz com que as ROIs do cátodo e do ânodo sejam produzidas e desenhadas sobre as imagens do vídeo. A interface do *software* após estas etapas pode ser visualizada na Figura 4.5, na qual o contorno da ROI do ânodo é desenhado em azul e o contorno da ROI do cátodo, em verde. É possível alternar entre mantê-las visíveis ou escondê-las por meio do botão *Show ROIs*. Baseado na máscara que é calculada para a célula nesta etapa, o programa mostra, na parte superior da interface, as dimensões aproximadas da célula (altura (*height*) x largura (*width*): *Cell Dimensions (h x w) (um)*) em micrômetros (Figura 4.5).

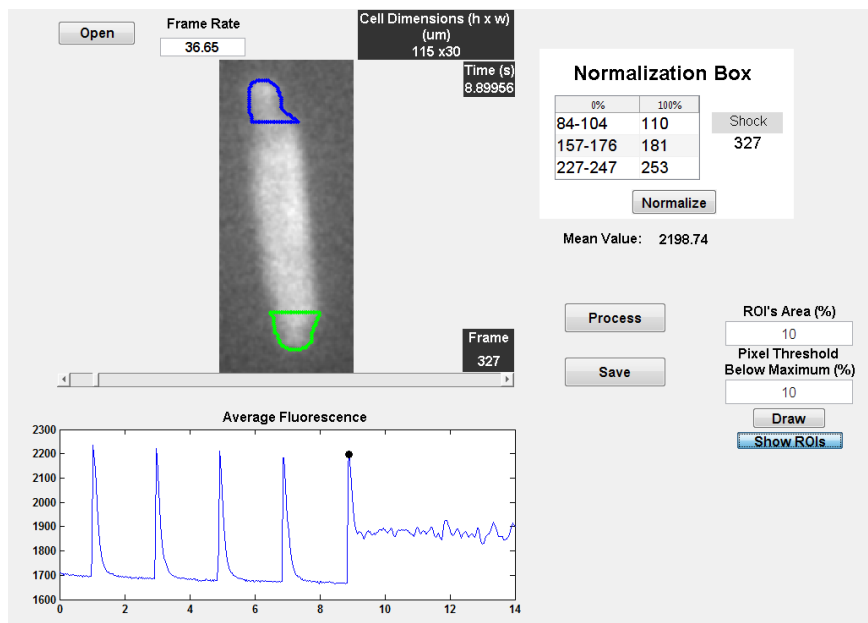


Figura 4.5: Interface do *software* após seleção de imagens de referência e desenho das ROIs.

O botão *Process* realiza o processamento das imagens, o que engloba a retirada do *offset*, cálculo das fluorescência médias, cálculo do limiar para marcação de pixels em vermelho e o destaque dos pixels que ultrapassaram o limiar. Uma barra de progressão, abaixo do botão *Process*, vai indicando a evolução do processamento. A Figura 4.6 mostra como a interface se modifica após o fim do processamento. A região do vídeo com a barra de rolagem agora mostra o vídeo após o processamento com pixels destacados em vermelho. O gráfico abaixo dela também é atualizado para agora mostrar a fluorescência média normalizada. Assim como antes, é possível percorrer o vídeo por meio da barra de rolagem enquanto um ponto preto no gráfico mostra o instante correspondente. Acima do botão *Process* alguns dados aparecem destacados em amarelo. Eles são a quantidade total de pixels em vermelho na imagem atual, e a quantidade deles que está dentro das regiões do ânodo e do cátodo (região amarela na Figura 4.6). Quando finaliza o processamento, o *software* automaticamente traça os dois gráficos de saída do programa em janelas separadas. Na própria janela do MATLAB é possível salvar as curvas.

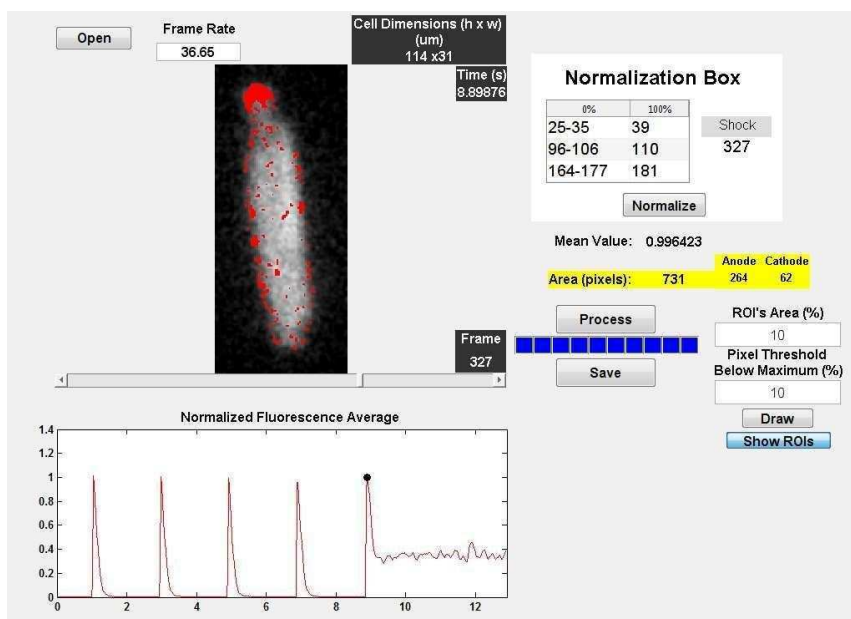


Figura 4.6: Interface do *software* pós-processamento.

O botão *Save* possibilita salvar na memória, em formato ".avi", o vídeo processado que aparece na tela. O tempo de processamento de um vídeo típico com 6300 imagens foi de aproximadamente 7 minutos.

4.3 FORMATO DAS ROIS

A comparação da fluorescência com o uso de ROIs geralmente é feita com ROIs de formato geométrico padrão, por exemplo quadrados ou retângulos (Jaconi, et al., 2000; Kockskämper & Blatter, 2002), ou ROIs que englobem toda a célula (Fujiwara, Tanaka, Mani, Nakagami, & Takamatsu, 2008). Neste trabalho, foi necessário comparar regiões diferentes de um mesmo tipo de célula, porque a distribuição de V_m induzida por E uniforme externo não é uniforme ao longo da membrana, apresentando maiores amplitudes nas regiões mais próximas aos eletrodos (Kinosita Jr, et al., 1988; Hibino, Shigemori, Itoh, Nagayama, & Kinosita Jr, 1991; Kotnik, Pucihar, & Miklavčič, 2010). Para E de maior intensidade, regiões por ventura eletroporadas coincidem com as regiões de maior módulo de V_m (Kinosita Jr, et al., 1988; Hibino, Shigemori, Itoh, Nagayama, & Kinosita Jr, 1991; Hibino, Itoh, & Kinosita Jr, 1993; Kotnik, Pucihar, & Miklavčič, 2010). Junto a isso, os miócitos cardíacos são células com formato

não-esférico, aproximando-se mais de um paralelepípedo ou de um esferóide prolato. Desta forma, mudar a direção da aplicação de **E** faz com que formato e a localização das regiões eletroporadas também mude (Klauke, Smith, & Cooper, 2010). Portanto, era interessante estabelecer um método que fosse capaz de comparar variações de fluorescência de ROIs diferentes de maneira padronizada.

A Figura 4.7 mostra uma comparação dos resultados da fluorescência média normalizada calculada a partir das ROIs do *software* e de ROIs geométricas de área e formato similares. As ROIs geométricas foram posicionadas de tal forma que ficassem o mais próximo possível das extremidades da célula, mas sem incluir o plano de fundo. A Figura 4.7 A mostra a imagem de fluorescência de um miócito do grupo longitudinal com as ROIs do programa para ânodo (azul) e cátodo (verde) e ROIs quadradas de área equivalente, também sobre ânodo (tracejado ciano) e cátodo (tracejado amarelo). A Figura 4.7 B apresenta as médias (barras) com erros padrão da média (linhas verticais) da fluorescência média normalizada para as ROIs geradas pelo *software*, calculadas para todas as células do grupo longitudinal. Similarmente, a Figura 4.7 C apresenta as médias e erros padrão da média para as ROIs quadradas calculadas para o grupo longitudinal. A Figura 4.7 D mostra a imagem de fluorescência de um miócito do grupo transversal com as ROIs geradas pelo *software* (azul e verde) e duas ROIs de formato e área semelhantes aos das ROIs do programa (retângulos tracejados em ciano e amarelo). Seguindo o mesmo princípio, as Figuras 4.7 E e F mostram as médias e erros padrão da média de todas as células do grupo transversal para as ROIs geradas pelo *software* (Figura 4.7 E) e para as ROIs retangulares (Figura 4.7 F).

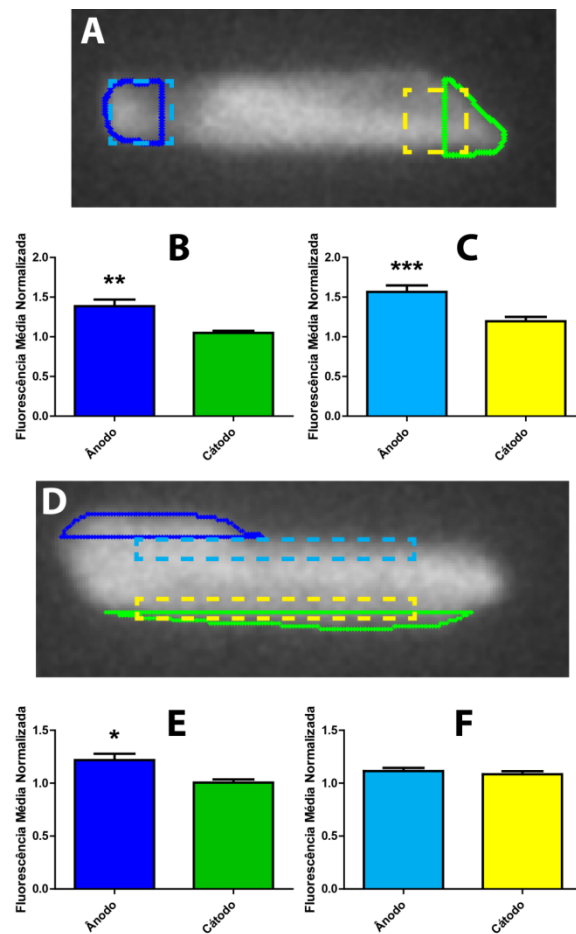


Figura 4.7: Comparação entre as ROIs geradas pelo *software* desenvolvido e ROIs geométricas: A. Imagem de fluorescência de miócito após aplicação de **E** longitudinalmente ao maior eixo da célula. ROIs do ânodo em azul (gerada pelo *software* desenvolvido) e ciano (quadrada). ROIs do cátodo em verde (gerada pelo *software* desenvolvido) e amarelo (quadrada). B. Médias e erros padrão da média do grupo longitudinal para as ROIs geradas pelo *software* desenvolvido. C. Médias e erros padrão da média do grupo longitudinal para as ROIs quadradas. D. Imagem de fluorescência de miócito após aplicação de **E** transversalmente ao maior eixo da célula. ROIs do ânodo em azul (gerada pelo *software* desenvolvido) e ciano (retangular). ROIs do cátodo em verde (gerada pelo *software* desenvolvido) e amarelo (retangular). E. Médias e erros padrão da média da fluorescência das ROIs para o grupo transversal para as ROIs geradas pelo *software* desenvolvido. F. Médias e erros padrão da média da fluorescência das ROIs para o grupo transversal para as ROIs retangulares.

Nota-se que para o grupo longitudinal, os dois tipos de ROIs foram capazes de revelar as diferenças de fluorescência entre ânodo e cátodo ($P < 0,05$, Figura 4.7 B e C) porque nesta direção o aumento de fluorescência é mais bem localizado, compreendendo toda a região voltada para cada eletrodo, especialmente a do ânodo. Por outro lado, a localização do aumento de fluorescência para o grupo na transversal é menos precisa porque a área voltada para cada eletrodo é maior neste caso. Ainda assim, este aumento normalmente ocorre na região mais proeminente em direção a cada eletrodo, de modo que protuberâncias ou regiões que estejam

mais expostas para o lado de um eletrodo, devido a uma leve inclinação por exemplo, estarão mais sujeitas a apresentar um aumento maior na fluorescência (Teruel & Meyer, 1997). ROIs quadradas, neste grupo, incluíam uma região bem mais interior da célula e, em certos casos, podiam se sobrepor se a célula tiver 2a muito pequeno. Tentamos modificar o formato (mantendo uma área equivalente) das ROIs quadradas, utilizando retângulos, com o objetivo de aumentar a abrangência da região analisada e reduzir a parcela da parte interior (centro da célula) na análise. Mesmo assim, as ROIs retangulares não conseguiram expressar a diferença entre ânodo e cátodo ($P > 0,05$) enquanto que as ROIs produzidas pelo *software* capturam melhor as extremidades da célula e foram capazes de demonstrar essa diferença ($P < 0,05$, Figura 4.7 E e F).

Além disso, tentamos comparar uma área com aumento de fluorescência mais significativo pós-choque, destacando pixels em vermelho. ROIs geométricas, como as mostradas em Figura 4.7 A e D, poderiam deixar de fora da análise regiões que manifestassem aumentos significativos. As ROIs do *software* abrangem todos os pixels das extremidades voltadas para os eletrodos e, portanto, se mostraram mais adequadas também para este método de análise.

4.4 EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

O protocolo experimental foi executado sobre 5 células com maior eixo orientado na transversal em relação ao **E** e 5 células com maior eixo orientado na longitudinal.

4.4.1 Comparação da Fluorescência Entre Ânodo e Cátodo

Fizemos a comparação da variação de fluorescência entre lado da célula voltado para o ânodo e lado da célula voltado para o cátodo, pós-choque, com base nas ROIs produzidas pelo *software* de análise. A comparação foi feita por meio das duas saídas que o programa fornece, isto é, pela média de fluorescência e pela razão das áreas.

A Figura 4.8 apresenta os gráficos de saída do *software* para um miócito com 2c orientado paralelamente às linhas de campo elétrico (Figura 4.8 A e C) e os gráficos com os resultados para todas as células (juntando os grupos longitudinal e transversal, Figura 4.8 B e D). O traçado da Figura 4.8 A e o gráfico de barras em Figura 4.8 B foram gerados a partir da fluorescência média

normalizada pós-choque em cada região. Similarmente, os gráficos em Figura 4.8 C e D foram feitos com a razão das áreas (área destacada em vermelho sobre área total da célula) no instante pós-choque. As setas pretas em Figura 4.8 A e C indicam o momento da aplicação do choque e os asteriscos em Figura 4.8 B e D indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

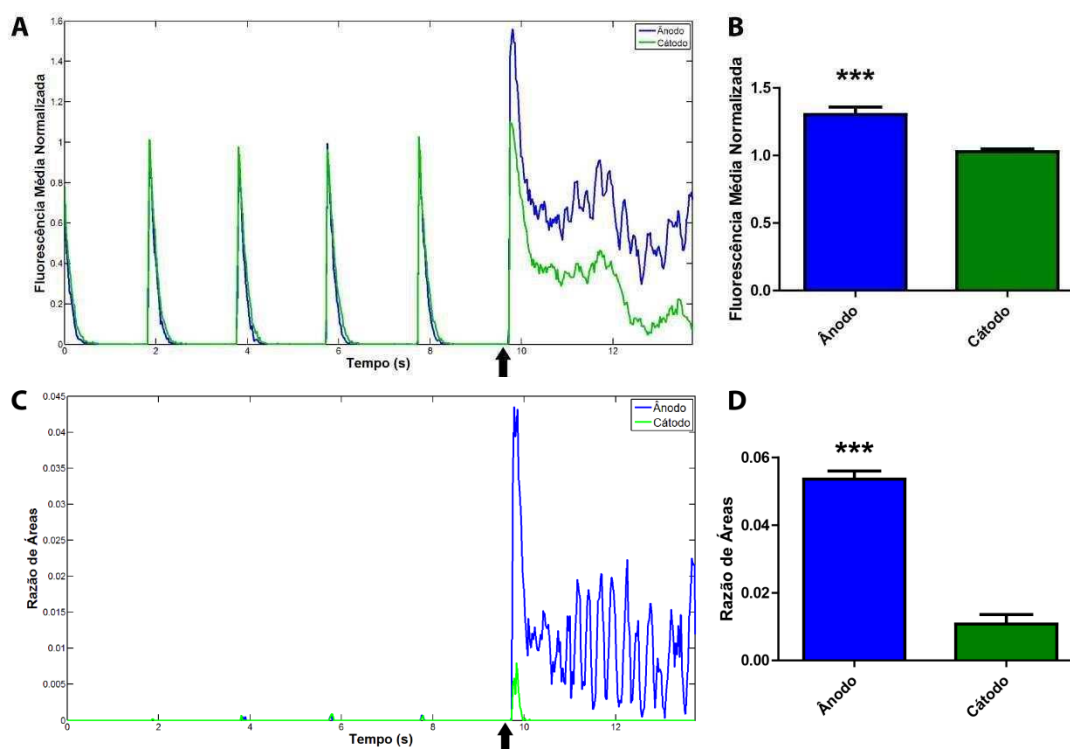


Figura 4.8: A. Gráfico da fluorescência média normalizada em função do tempo de uma célula, para ROI do ânodo e ROI do cátodo. A seta indica o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade. B. Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da fluorescência média do pico de fluorescência pós-choque normalizada ($n=10$), para ROI do ânodo e ROI do cátodo. C. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total em função do tempo, para ROI do ânodo e ROI do cátodo. D. Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total após a aplicação do choque ($n=10$), para ROI do ânodo e ROI do cátodo. Asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

4.4.2 Comparação da Fluorescência entre Grupos Longitudinal e Transversal

Separámos as células em grupos, longitudinal e transversal. Os dois grupos foram primeiramente comparados quanto às suas dimensões físicas, intensidade de E_T e $\Delta V_{\max T}$. A Tabela 4.1 e a Figura 4.9 mostram os valores de média \pm erro padrão desses parâmetros.

Tabela 4.1: Características dos grupos: média \pm erro padrão de $2c$, $2a$, E_T e $\Delta V_{\max T}$. O asterisco indica $P < 0,05$.

Grupo	$2c$ (μm)	$2a$ (μm)	E_T (V/cm)	$\Delta V_{\max T}$ (mV)
Longitudinal	$123,80 \pm 2,56$	$27,91 \pm 1,32$	$4,01 \pm 0,13$	$21,12 \pm 0,57$
Transversal	$127,40 \pm 5,32$	$26,72 \pm 1,99$	$9,65 \pm 0,38^*$	$24,16 \pm 1,38$

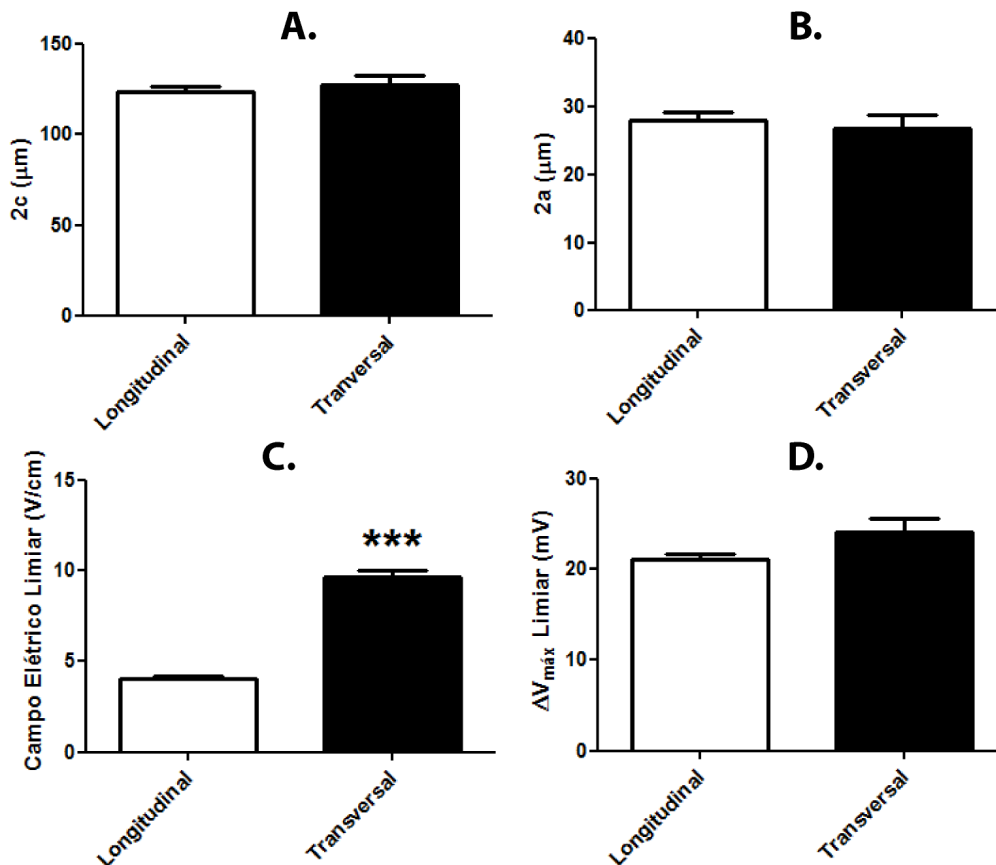


Figura 4.9: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais), para células orientadas nas direções longitudinal ($n=5$) e transversal ($n=5$) em relação às linhas de campo elétrico, dos seguintes fatores: A. comprimento do maior eixo ($2c$). B. comprimento do menor eixo ($2a$). C. Campo elétrico limiar (E_T). D. Variação máxima do potencial transmembrana ($\Delta V_{\max T}$) após estímulo limiar. Asteriscos indicam diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

A Figura 4.10 mostra algumas imagens e os resultados para uma célula do grupo longitudinal. A Figura 4.10 A apresenta o miócito iluminado pelo LED RGB verde antes da etapa de fluorescência. A seta branca indica a direção na qual E foi aplicado. A Figura 4.10 B mostra a imagem de fluorescência em resposta a um estímulo de baixa intensidade. A Figura 4.10 C contém a imagem de fluorescência no mesmo instante, porém tratada pelo filtro gaussiano e com as ROIs do ânodo (azul) e do cátodo (verde) desenhadas. Após o processamento, a imagem da

Figura 4.10 C se transforma na imagem em Figura 4.10 D, onde quase não se observa pixels em vermelho. A Figura 4.10 E também mostra uma imagem do vídeo processado, mas num instante após o estímulo de alta intensidade. Nota-se muitos pixels destacados em vermelho, em especial na região voltada para o ânodo. O gráfico da Figura 4.10 F é a fluorescência média normalizada para as ROIs do ânodo e do cátodo em função do tempo. Não está presente o traçado para a célula inteira porque ele não se distingue do traçado da ROI do cátodo (ver Figura 4.8 A e B). A Figura 4.10 G contém o traçado da razão da área destacada em vermelho pela área total em função do tempo para a ROI do ânodo, ROI do cátodo e célula inteira. Neste exemplo, o traçado da ROI do ânodo praticamente acompanhou o da célula inteira. As setas pretas em Figura 4.10 F e G mostram o momento da aplicação do choque .

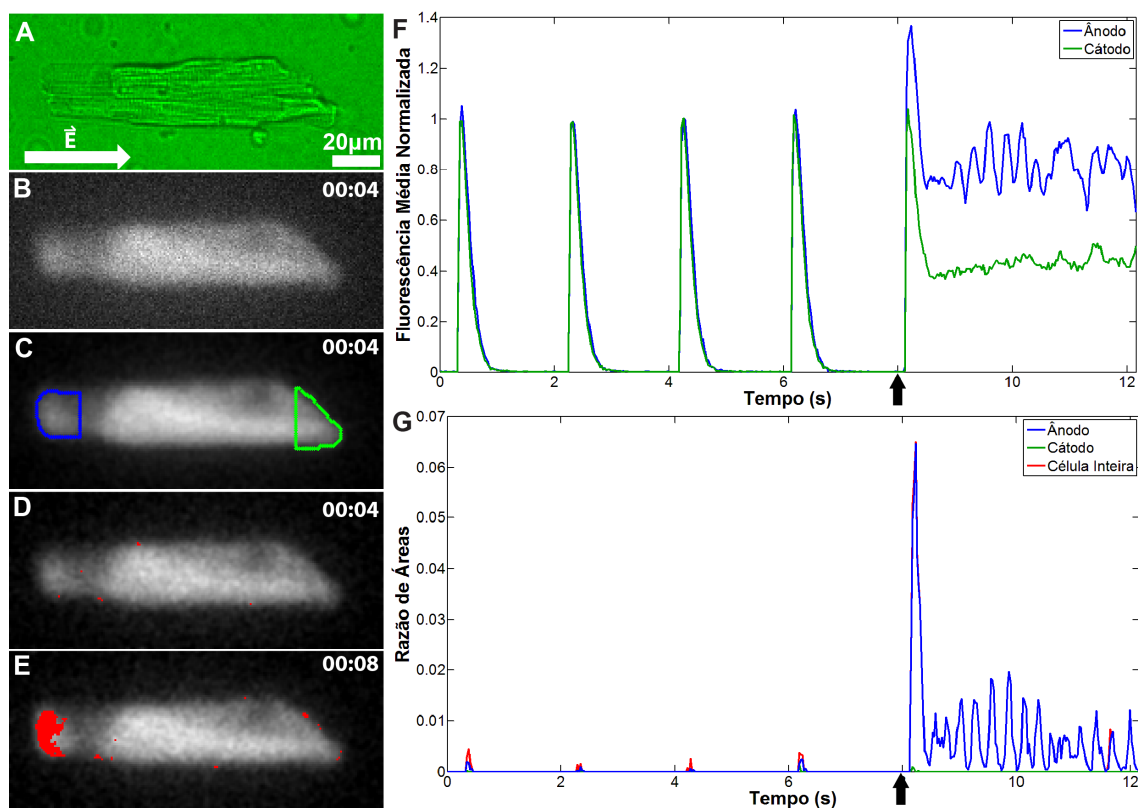


Figura 4.10: A. Imagem do miócito sem fluorescência com maior eixo orientado longitudinalmente às linhas de campo elétrico. Seta branca indica a direção do campo elétrico aplicado. B. Imagem de fluorescência da célula após estímulo de baixa intensidade. C. Mesma imagem de fluorescência tratada com filtro gaussiano e com ROIs do ânodo (azul) e do cátodo (verde) desenhadas sobre imagem. D. Imagem de fluorescência pós-processamento, com pixels que ultrapassam o limiar pintados de vermelho, após estímulo de baixa intensidade. E. Imagem pós-processamento após aplicação do estímulo de alta intensidade (choque). F. Gráfico da fluorescência média normalizada pelo tempo para as ROIs do ânodo e do cátodo. G. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total para a célula inteira, ROI do ânodo e na ROI do cátodo. As setas pretas indicam o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade.

Uma figura semelhante para uma célula do grupo transversal é ilustrada na Figura 4.11. Na Figura 4.11 A temos a imagem da célula sem fluorescência com a direção do **E** de alta intensidade indicada pela seta branca. Da mesma forma, a Figura 4.11 B mostra uma imagem de fluorescência capturada pela câmera após um estímulo de baixa intensidade, a Figura 4.11 C é a mesma imagem com filtro gaussiano e ROIs desenhadas, a Figura 4.11 D é a mesma imagem, mas já processada e Figura 4.11 E é a imagem processada pós-choque. A Figura 4.11 F mostra o gráfico da fluorescência média normalizada em função do tempo para a célula em questão nas ROIs do ânodo e do cátodo e a Figura 4.11 G mostra a razão de áreas da mesma célula na ROI do ânodo, ROI do cátodo e célula inteira. As setas pretas indicam o momento da aplicação do estímulo elétrico de alta intensidade.

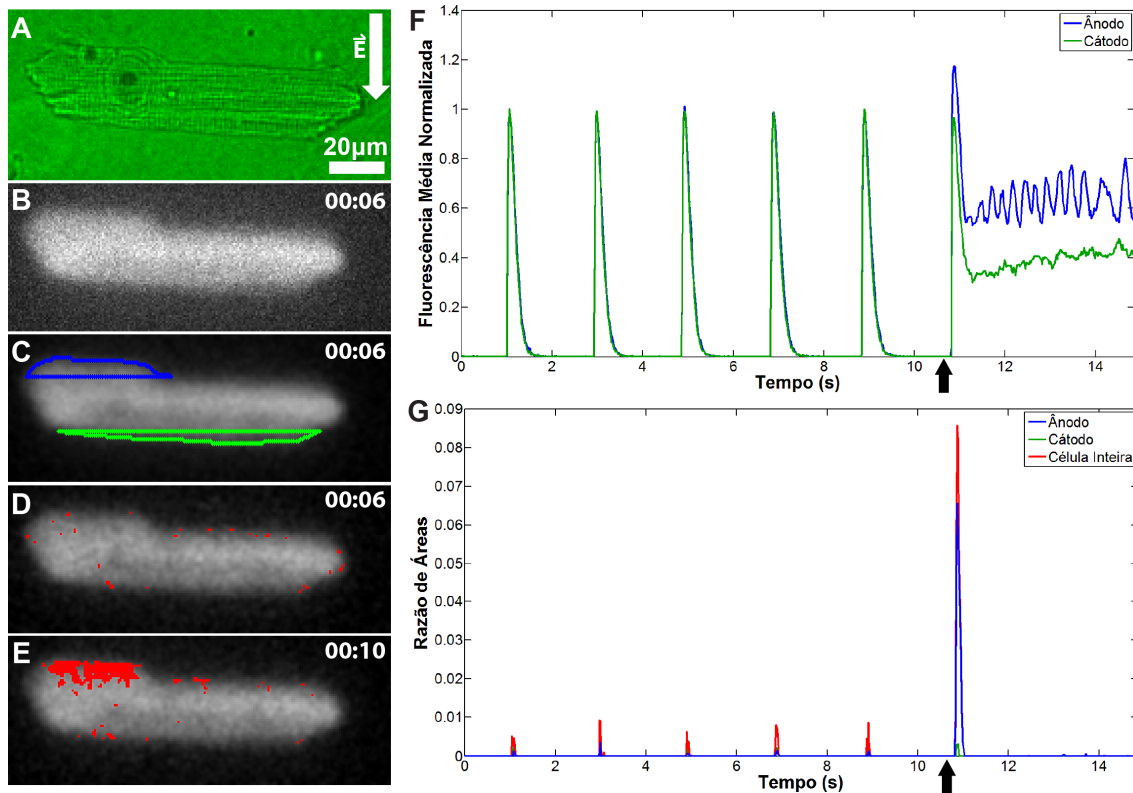


Figura 4.11: A. Imagem do miócito sem fluorescência com maior eixo orientado transversalmente às linhas de campo elétrico. Seta branca indica a direção do campo elétrico aplicado. B. Imagem de fluorescência da célula após estímulo de baixa intensidade. C. Mesma imagem de fluorescência tratada com filtro gaussiano e com ROIs do ânodo (azul) e do cátodo (verde) desenhadas sobre imagem. D. Imagem de fluorescência pós-processamento, com pixels que ultrapassam o limiar pintados de vermelho, após estímulo de baixa intensidade. E. Imagem pós-processamento após aplicação do estímulo de alta intensidade (choque). F. Gráfico da fluorescência média normalizada pelo tempo para as ROIs do ânodo e do cátodo. G. Gráfico da razão da área que ultrapassa o limiar sobre a área total para a célula inteira, ROI do ânodo e na ROI do cátodo. As setas pretas indicam o momento da aplicação do estímulo de alta intensidade.

Por fim, comparamos os grupos para as variações de fluorescência em resposta ao choque, buscando investigar se a direção de aplicação de **E** tem influência na fluorescência associada ao Ca^{2+} . Realizamos as comparações utilizando os picos pós-choque dos dois gráficos de saída do *software* de análise (fluorescência média normalizada e razão de áreas) levando em conta a direção de **E** (grupo transversal e longitudinal) e a ROI (ânodo e cátodo). A Tabela 4.2 e a Figura 4.12 revelam as médias e os erros padrão das médias destes resultados. O gráfico na Figura 4.12 A. foi construído a partir dos gráficos de fluorescência média normalizada, isto é, a partir de gráficos como os mostrados em Figura 4.8 A, Figura 4.10 F e Figura 4.11 F. O gráfico na Figura 4.12 B. foi gerado a partir dos gráficos da razão entre áreas, ou seja, a partir de gráficos como em Figura 4.8 C, Figura 4.10 G e Figura 4.11 G. Como previsto pela análise preliminar do tópico 4.4.1, houve diferença estatística significativa para as regiões do ânodo e cátodo em ambas as saídas do programa. Houve também diferença estatística relevante entre estímulo transversal e longitudinal para a razão de áreas. Pós-testes não indicaram diferença estatística significativa.

Tabela 4.2: Média \pm erro padrão da média da fluorescência média normalizada e da razão de áreas para os grupos longitudinal e transversal, analisadas em ROI do ânodo e ROI do cátodo.

Grupo	Fluorescência Média Normalizada		Razão de Áreas	
	ROI do Ânodo	ROI do Cátodo	ROI do Ânodo	ROI do Cátodo
Longitudinal	1,387 \pm 0,082	1,05 \pm 0,025	0,052 \pm 0,004	0,007 \pm 0,002
Transversal	1,218 \pm 0,06	1,006 \pm 0,03	0,055 \pm 0,003	0,015 \pm 0,005

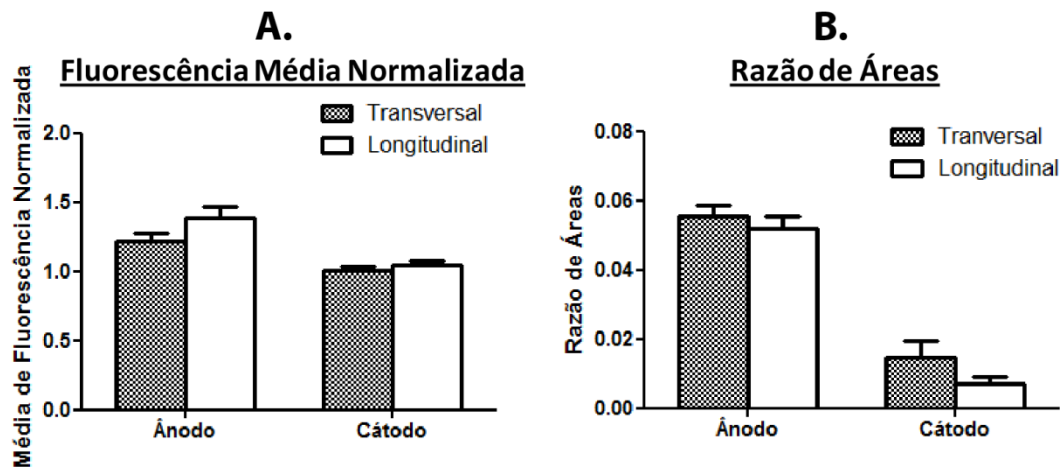


Figura 4.12: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da fluorescência média normalizada (A.) e da razão da área que ultrapassou o limiar sobre a área total (B.) pós-choque, para células orientadas nas direções longitudinal ($n=5$) e transversal ($n=5$) em relação às linhas de campo elétrico, analisadas nas regiões da ROI do ânodo e da ROI do cátodo.

5 DISCUSSÃO

5.1 INSTRUMENTAÇÃO

A produção de um sistema desse nível exige um estudo elaborado das funções de cada componente e uma grande quantidade de testes antes de se chegar ao resultado final onde o sinal de fluorescência é adequadamente capturado pelo sensor. O conjunto de filtros ópticos foi cuidadosamente selecionado para que o espectro de transmitância de cada filtro combinasse com os picos dos espectros de excitação e emissão do Fluo-3 (vide Figura 3.6).

O filtro de emissão garante que apenas luz nos mesmos comprimentos de onda de emissão do fluoróforo atinjam o sensor, assegurando que aqueles sinais correspondem à fluorescência proveniente da amostra. Entretanto, a iluminação ambiente, a qual apresenta emissão na faixa visível, é capaz de atravessar o filtro de emissão e interferir nas medidas. O envolvimento do sistema pela cortina corta-luz eliminou esta interferência.

Algumas fontes de luz foram testadas antes de decidirmos pela halógena. Uma lâmpada de vapor de mercúrio (ou lâmpada HBO) 100W forneceu radiação luminosa excessiva, causando dano foto-tóxico à amostra. Além disso, dentre os picos no seu espectro de emissão, nenhum deles bate com a faixa de excitação do Fluo-3, embora tenha sido possível observar fluorescência. Uma lâmpada halógena de 150W foi testada e apresentou efeito foto-tóxico similar. Um conjunto de LEDs também foi testado, mas não foi possível eliminar a projeção de cada LED sobre as imagens de fluorescência. A fonte de luz com lâmpada halógena 100W teve o melhor desempenho em nosso sistema porque sua lente difusora foi capaz de eliminar a projeção de seu filamento sobre as imagens de fluorescência, não gerou efeito foto-tóxico e conseguiu fornecer iluminação suficiente para excitar o indicador.

Outra característica das lâmpadas halógenas é que a amplitude de seu espectro de emissão na região visível aumenta com seu aumento de temperatura. Isto implica na necessidade de se manter a lâmpada acesa por um certo período de tempo até que sua temperatura se estabilize. Nesse tempo, o indicador de fluorescência ficaria exposto à luz de excitação antes mesmo que se pudesse iniciar o experimento, o que contribuiria para o desbotamento do mesmo. Eis a

importância da introdução de um *shutter* na saída da fonte de luz, permitindo que a fonte de luz seja ligada para estabilização da temperatura sem que luz chegue à amostra.

A temperatura do filamento da lâmpada pode chegar até 3000°C, o que pode elevar a temperatura do ambiente ao seu redor, ainda mais no ambiente fechado pela cortina. A elevação da temperatura dos miócitos pode causar alterações nos fluxos de Ca^{2+} , por exemplo na amplitude das correntes de Ca^{2+} do sarcolema (Cavalié, McDonald, Pelzer, & Trautwein, 1985) e na taxa e perfil de *sparks* (Fu, Zhang, Hao, Wu, Chai, & Wang., 2005). Somado a isso, o aumento de temperatura pode comprometer drasticamente a integridade do Fluo-3 (Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000). Na tentativa de impedir que essas alterações afetem o comportamento das células durante os experimentos, eles foram realizados num curto tempo imediatamente após a estabilização da iluminação da fonte de luz (duração de cerca de 3 minutos pós-estabilização). Um protocolo rápido também é conveniente porque ameniza o efeito de desbotamento do Fluo-3 (tempo para queda de metade da fluorescência $t_{1/2} = 143\text{s}$, Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000).

O aumento de temperatura da lâmpada, além de aumentar a emissão na região visível, diminui a emissão na faixa do infra-vermelho. Ainda assim, a maior parte da radiação emitida por lâmpadas halógenas se concentra na região infra-vermelha do espectro (vide Figura 3.4), o que reflete num fornecimento de calor considerável ao sistema. Portanto, o filtro anti-calórico é um componente fundamental. Para sua escolha, testamos dois modelos: SCHOTT KG1 e KG3. Ambos possuem um espectro de transmitância similar, porém o KG1 possui transmitância levemente maior para todos os comprimentos de onda. Por conta disso, embora ele atenuem um pouco menos luz no infra-vermelho do que o KG3, ele possibilita que mais luz na faixa do azul o atravesse, portanto ele foi a escolha para o sistema.

Buscamos obter a melhor resolução espacial possível nas imagens de fluorescência. Com esse objetivo, é interessante que a imagem do miócito pudesse preencher quase que completamente o sensor da câmera, esteja ele orientado na vertical ou na horizontal. Desta forma, cada pixel da imagem representa uma pequena região da célula e pode-se obter mais informação. Dois aspectos determinantes para o ajuste do tamanho da imagem sobre o sensor são a ampliação da lente objetiva e a distância do caminho óptico entre a amostra e o sensor da câmera. Testamos as lentes objetivas para fluorescência de 16x (NPL 16/0.45 160/0.17, Leica, Wetzlar, Alemanha), 25x (NPL 25/0.55 160/0.17, Leica, Wetzlar, Alemanha) e 40x (FL 40/1.30 160/0.17, Leica,

Wetzlar, Alemanha), além de uma outra objetiva 40x (Ph2 Neofluar 40/0.75 160/0.17, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As objetivas de 16x e 25x ofereceram boa transmitância, mas ampliação abaixo do almejado. Nas objetivas de 40x, a ampliação foi satisfatória, fazendo com que um miócito de tamanho típico ($2c$ entre 100 e 130 μ m) preenchesse quase que completamente o sensor. No entanto, a FL 40/1.30 atenuou menos o sinal de fluorescência em comparação com a Ph2 Neofluar 40/0.75, provavelmente por dispor de uma abertura numérica maior, e por isso optamos por ela. Com relação à distância do caminho óptico, observamos que uma maior distância implica em maior ampliação da imagem, porém com mais perdas. Com isso, concluímos que a melhor configuração seria a utilização de uma objetiva com ampliação mais elevada (como a de 40x) e uma distância mínima entre amostra e sensor. Isto explica porque a câmera foi acoplada bem próxima ao sistema. O acoplamento foi feito lateralmente para se diminuir a deposição de poeira no sensor da câmera.

Em suma, este trabalho produziu um sistema de microscopia adaptando-se alguns componentes de outros equipamentos desativados e projetando-se outras peças para completar o sistema. Isto resultou num microscópio com custo de produção bastante reduzido. A Tabela 5.1 mostra os custos dos componentes do microscópio, com o valor total em reais, sem incluir a câmera.

Tabela 5.1: Custos do microscópio produzido.

Estrutura	Características	Valor Unitário (R\$)	Quantidade	Custo (R\$)	Observações
Fonte de Luz	Com lâmpada halógena 100W	0	1	0	Desativado de equipamento hospitalar
Base de Microscópio com <i>Chariot</i>		0	1	0	Obtido de microscópio desativado
Trocador de Objetivas		0	1	0	Obtido de microscópio desativado
Suporte para Cubos, <i>Shutter</i> e Acopladores	Peças de alumínio ou latão anodizadas	50	1	50	
Filtro Anti-calórico	SCHOTT KG1	219	1	219	
Lentes Objetivas 10x e 40x	Zeiss	0	1	0	Obtido de microscópio desativado
Dois Cubos Ópticos	Módulo Refletor FL	353	2	706	
Conjunto de Filtros Ópticos	Zeiss 46-HE	3788,38	1	3788,38	
Espelho de Primeira Superfície	Dimensões: 25,5mm x 36mm x 2mm	150	1	150	
TOTAL				4913,38	

Um microscópio invertido para fluorescência, com conjunto de filtros e lentes objetivas, custa, atualmente, por volta de R\$ 25.000 a R\$30.000. Apesar de um microscópio comercial poder conter algumas funcionalidades extras, mostramos que é possível fabricar um microscópio de fluorescência, a um custo relativamente baixo, aproveitando componentes de outros equipamentos desativados.

5.2 SOFTWARE DE ANÁLISE

O programa desenvolvido neste projeto atendeu aos objetivos, possibilitando uma investigação dos efeitos associados ao Ca^{2+} causados por **E** de alta intensidade. O programa tomou como base uma porcentagem da área total (10%) nas extremidades da célula voltadas para os eletrodos. Esta abordagem se mostrou mais eficaz do que métodos mais tradicionais de ROIs geométricas porque conseguiu demonstrar as diferenças no influxo e liberação de cálcio entre ânodo e cátodo após a célula sofrer um choque de alta intensidade para ambos os grupos.

Uma consideração a ser feita com relação ao uso de ROI em sistemas biológicos é que em alguns casos a amostra pode se movimentar, como é o caso das cardiomiócitos quando estimulados por **E**. Utilizamos uma correção de artefato de movimento por meio de uma filtragem, mas pode-se imaginar que talvez apenas essa correção fosse insuficiente para eliminar este efeito. Uma maneira seria aplicar uma droga que impedisse a contração dos sarcômeros, mas não o fizemos porque queríamos analisar o comportamento das células sem a introdução de drogas. Além disso, o uso da droga aumentaria o tempo de execução dos experimentos. Outro ponto é que a contração da célula quando recebe **E** de alta intensidade é em geral maior do que quando ela recebe estímulos de baixa intensidade. O resultado disso é um encurtamento maior na direção do eixo $2c$ e um leve aumento na direção de $2a$ e de $2b$ (eixo relacionado à profundidade). As ROIs da célula foram obtidas a partir da máscara da célula, e esta surgiu da binarização do resultado da subtração entre IM_{Picos} e IM_{Base} . Isto gera uma máscara cujas fronteiras estão em algum ponto entre as bordas quando a célula está em repouso e quando ela está respondendo ao estímulo de baixa intensidade. Desse jeito, a contração evocada pelo choque tenderia a encurtar mais a célula e deixar regiões próximas às extremidades do eixo $2c$ com pixels de plano de fundo. Entretanto, na prática não é o que se observou. Mesmo após a aplicação dos

choques, não observamos o aparecimento do plano de fundo dentro das ROIs. Acreditamos que isso se deveu a dois fatores: o filtro gaussiano deve ter contribuído para que essa diferença tenha sido menos expressiva e o fato de os choques serem sub-letais também deve ter amenizado a forte contração observada quando se aplica campos elétricos letais (Oliveira P. X., 2004; Oliveira P. X., 2008).

O desbotamento do indicador de fluorescência se manifestou com maior ou menor intensidade dependendo do tempo em que o indicador ficou exposto à luz de excitação antes do registro em vídeo. O método de correção de desbotamento incorporado no *software* permitiu corrigir esse desbotamento em todas as imagens dos vídeos, independente do grau de decaimento da fluorescência de cada experimento, pois ele corrigiu o desbotamento tomando o próprio decaimento como a base para a correção. O bom desempenho desta correção pode ser inferido pelo paralelismo entre o eixo x de gráficos de fluorescência média com a fluorescência média durante períodos de repouso, e também pela concordância de valores dos picos dos transientes após a correção, a qual não ocorria antes da correção (ver Figura 3.13, onde inclusive o pico de fluorescência pós-choque está menor do que os picos dos transientes).

5.3 ASSIMETRIA ENTRE ÂNODO E CÁTODO

Como podemos observar nas Figuras Figura 4.8, Figura 4.10 e Figura 4.11, há uma assimetria entre a fluorescência do ânodo e do cátodo. Esta assimetria pós-choque também foi relatada na literatura no perfil de V_m ao redor da célula pós-choque (Hibino, Itoh, & Kinosita Jr, 1993), na $[Ca^{2+}]_i$ (Hibino, Shigemori, Itoh, Nagayama, & Kinosita Jr, 1991; Kinosita Jr, Itoh, Ishiwata, Hirano, Nishizaka, & Hayakawa, 1991; Hibino, Itoh, & Kinosita Jr, 1993; Teruel & Meyer, 1997; DeBruin & Krassowska, 1999b), a densidade de poros (DeBruin & Krassowska, 1999b), no influxo de partículas impermeáveis, como iodeto de propídio (Kotnik, Pucihar, & Miklavčič, 2010) ou corante neutro (Mehrlé, Hampp, & Zimmermann, 1989) e na lesão causada (Knisley & Grant, 1995). Ambas as extremidades voltadas para os eletrodos (regiões polares) sofrem eletroporação (aplainamento do perfil de V_m , Kinosita Jr, et al., 1988; Hibino, Shigemori, Itoh, Nagayama, & Kinosita Jr, 1991) e influxo de moléculas outrora impermeáveis (Kotnik, Pucihar, & Miklavčič, 2010).

Kinosita e colaboradores (Kinosita Jr, Itoh, Ishiwata, Hirano, Nishizaka, & Hayakawa, 1991; Hibino, Shigemori, Itoh, Nagayama, & Kinosita Jr, 1991; Hibino, Itoh, & Kinosita Jr, 1993) observaram um influxo de Ca^{2+} nas duas regiões polares de ovos (zigotos) de ouriço-do-mar, com uma concentração inicial maior no lado do ânodo, porém uma inversão (após cerca de 10s) dessa diferença de concentração, com o lado voltado para o cátodo permanecendo com uma concentração maior. Eles atribuíram esta diferença a eletroforese, quando Ca^{2+} externo se acumularia no lado do ânodo durante a aplicação do pulso elétrico e tenderia a entrar na célula mais prontamente com a formação de poros. Mas a inversão ocorreria por causa de uma taxa de selamento da membrana menor no lado do cátodo.

Entretanto, outros trabalhos com eletroporação mostraram o lado do ânodo como tendo maior influxo de moléculas sem carga (Mehrle, Hampp, & Zimmermann, 1989), maior $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Teruel & Meyer, 1997; DeBruin & Krassowska, 1999b) e maior lesão (Knisley & Grant, 1995). Inclusive, Knisley & Grant, 1995, trabalharam com miócitos ventriculares de coelho, o que sugere um comportamento semelhante para miócitos ventriculares isolados de rato. Nosso trabalho apresentou uma maior fluorescência relacionada à $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no lado voltado para o ânodo para as duas orientações de miócitos.

A explicação inicial para a assimetria era de que V_m de repouso é sobreposto pela variação de potencial transmembrana não uniforme devida à aplicação de \mathbf{E} . Desta forma, um dos pólos (voltado para o cátodo) ficaria despolarizado enquanto o outro (voltado para o ânodo) ficaria hiperpolarizado, com um módulo de V_m maior, e isto faria com que houvesse uma maior eletroporação no lado do ânodo (Mehrle, Hampp, & Zimmermann, 1989). No entanto, esta hipótese foi derrubada por estudos experimentais onde V_m foi anulado, e ainda assim houve assimetria (Knisley & Grant, 1995; Teruel & Meyer, 1997).

Outra hipótese trata das diferenças de concentração de íons entre os meios intra e extracelular. DeBruin & Krassowska, 1999b elaboraram um modelo que leva em conta as concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} na densidade de poros resultante da aplicação de um pulso de \mathbf{E} de alta intensidade. Para uma célula esférica, a corrente através da membrana (I_m) é calculada da seguinte maneira:

$$I_m = C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + I_{ion} + I_{ep} \quad [5.1]$$

onde C_m é a capacitância da membrana, V_m o potencial transmembrana, I_{ion} a corrente iônica (passiva) e I_{ep} a corrente por eletroporação. Os autores associam as permeabilidades e as concentrações dos íons a I_{ep} . Com este modelo, eles mostram que V_m de repouso tem influência praticamente irrelevante sobre I_{ep} e que as diferenças de concentração de todos estes íons têm participação na assimetria da eletroporação. Esta evidência ganha suporte de alguns modelos de simulação molecular que incluem uma diferença do número total de íons nos dois lados de uma membrana fosfolipídica como fator facilitador na formação de poros (Gurtovenko & Vattulainen, 2005; Gurtovenko & Vattulainen, 2007; Delemotte & Tarek, 2012).

Outra teoria que pode colaborar ou explicar a assimetria foi proposta por (Teruel & Meyer, 1997). Eles fazem referência à característica assimétrica da distribuição dos fosfolípides nas duas camadas da membrana (Quinn, 2002), ressaltando que a camada interna da membrana possui maior concentração de fosfolípides com cargas negativas. A aplicação de E favoreceria a movimentação das cabeças polares desses fosfolípides na direção do ânodo, facilitando a formação de poros neste lado da membrana. A Figura 5.1 ilustra esse processo.

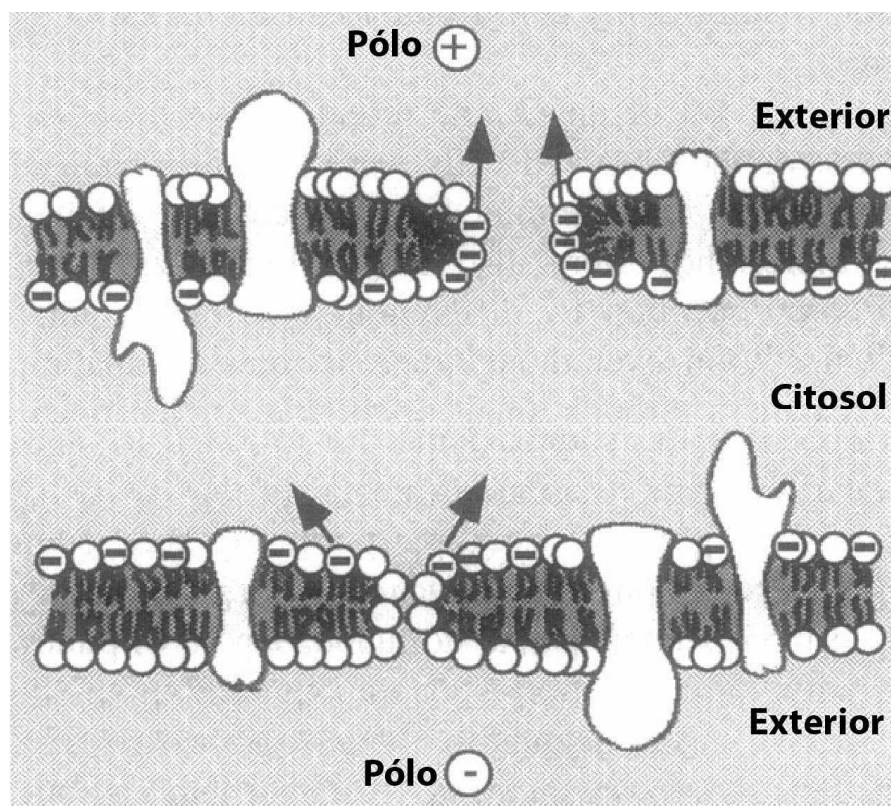


Figura 5.1: Assimetria na formação de poros entre membrana voltada para pólo positivo e negativo (modificado de Teruel & Meyer, 1997, licença número 3411470026619).

As simulações realizadas por (Böckmann, de Groot, Kakorin, Neumann, & Grubmüller, 2008) mostram uma variação de ângulo maior das cabeças polares na monocamada voltada para o ânodo (pólo positivo) com o aumento de E aplicado. A princípio, isto teria efeito sobre os dois lados da célula, mas na bicamada do lado do cátodo, este efeito poderia ser diminuído pelas cargas negativas da monocamada interna, enquanto que, no lado do ânodo, não haveria empecilho, já que a monocamada anódica é, neste caso, aquela voltada para o exterior (Figura 5.1).

Até o momento, desconhece-se quais são os principais fatores por trás desta assimetria na lesão. Acreditamos que uma cooperação entre assimetria dos fosfolípides da membrana e diferenças de concentração de íons seja a mais provável explicação. Nosso trabalho não é capaz de provar nenhuma dessas teorias, ainda assim nossos resultados estão de acordo com as simulações e dados experimentais citados.

5.4 GRUPOS LONGITUDINAL E TRANSVERSAL

As dimensões $2c$ e $2a$ (Tabela 4.1) estão de acordo com valores encontrados na literatura (Oliveira P. X., 2004; Goulart, Oliveira, Bassani, & Bassani, 2012). Nossos valores de E_T para os grupos longitudinal e transversal (Tabela 4.1) foram ligeiramente maiores do que os reportados em trabalho anterior de nosso grupo (Oliveira P. X., 2004), entretanto E_T do grupo transversal foi 2,41 vezes maior que E_T do grupo longitudinal, uma relação que condiz com a já reportada (Oliveira P. X., 2004). Com isto estimamos que os grupos celulares considerados neste trabalho não diferem dos grupos celulares citados da literatura com relação às dimensões e à resposta a estímulo elétrico externo.

A direção em que E é aplicado sobre miócitos cardíacos implica numa variação em E_T (Bassani, Lima, Gomes, Oliveira, & Bassani, 2006) e na porcentagem de letalidade (Oliveira, Bassani, & Bassani, 2008b). Nossos resultados confirmam a diferença para E_T (Tabela 4.1 e Figura 4.9) e mostraram diferença significativa de fluorescência num dos métodos de análise, o que pode ser resultado de uma lesão mais extensa no grupo transversal (Tabela 4.2 e Figura 4.12).

A lesão na membrana em resposta a E de alta intensidade pode estar associada a um aumento de $[Ca^{2+}]_i$ como resultado de eletroporação irreversível, que pode levar a hipercontratura

(Donck, Pauwels, Vandeplassche, & Borgers, 1986) e/ou dar início à apoptose (Quinn, 2002). Oliveira, Bassani, & Bassani, 2008b, mostraram que a aplicação de **E** de alta intensidade que produza uma $\Delta V_{\text{máx}}$ equivalente em células orientadas longitudinalmente e transversalmente em relação a **E**, gera uma porcentagem de letalidade maior para os miócitos orientados na transversal. Os autores calculam que a área em torno de $\Delta V_{\text{máx}}$ é cerca de 2,5 vezes maior para a transversal. Isto poderia provocar uma área eletroporada também maior já que a eletroporação ocorre quando V_m ultrapassa um certo limiar.

Buscamos associar uma maior área eletroporada a um aumento local maior da fluorescência associada à $[Ca^{2+}]_i$. Para melhor captar as variações espaciais da fluorescência, elaboramos a abordagem complementar (razão de áreas) à tradicional medida de fluorescência média em ROIs. Tal abordagem foi capaz de revelar uma diferença para células orientadas na longitudinal e na transversal. Isso provavelmente se deve a uma maior sensibilidade deste método, uma vez que, utilizando a média de fluorescência, pixels cuja variação de fluorescência foi relevante podem ter ficado mascarados pela média com outros pixels de pequena variação. Isto parece ser particularmente observável na ROI do cátodo, cuja fluorescência média é levemente maior na longitudinal, mas a razão de áreas na transversal se mostrou o dobro da longitudinal (Tabela 4.2).

Um ponto importante a se considerar em nossa análise é que não realizamos a calibração do Fluo-3 para obter a $[Ca^{2+}]_i$. De maneira geral, a quantificação de $[Ca^{2+}]_i$ livre, isto é, não ligado ao indicador, quando se utiliza um indicador de fluorescência não-ratiométrico, como o Fluo-3, provém da seguinte equação:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{[F - F_{\text{mín}}]}{[F_{\text{máx}} - F]} \quad [5.2]$$

onde K_d é a constante de dissociação do íon, F é a fluorescência medida, $F_{\text{mín}}$ é a fluorescência do indicador na ausência de Ca^{2+} e $F_{\text{máx}}$ é a intensidade de fluorescência do indicador em solução saturada em Ca^{2+} . O valor de K_d é fornecido pelo fabricante, no entanto estudos mostraram que este parâmetro, quando calculado *in situ*, pode resultar em valores muito diferentes do estipulado de fábrica (Harkins, Kurebayashi, & Baylor, 1993; Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000). Com isso, é importante que uma curva de calibração seja feita com o sistema utilizado a fim de se determinar K_d . Após isso, em cada experimento, é

necessário medir F_{min} , por exemplo utilizando-se uma solução com EGTA, e F_{max} através da introdução de uma solução com alta concentração de Ca^{2+} (~2mM). Estas medições são fundamentais e, ao mesmo tempo, devem ser executadas com certa rapidez porque o Fluo-3 é mais sujeito ao desbotamento do que outros indicadores de fluorescência para Ca^{2+} (Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000).

Visto que nosso objetivo não é quantificar a $[Ca^{2+}]$, mas sim utilizá-la como um artifício para investigar eletroporação, não consideramos necessária a calibração, porém realizamos a normalização pelas variações dos transientes de fluorescência. Embora tais transientes possam variar de célula para célula, nós medimos a variação supra-transiente em cada célula de maneira que, mesmo que hajam variações, o que estamos comparando é a variação normalizada acima do transiente. Com isto, estamos quantificando um sinal de fluorescência que corresponde à variação extra apresentada por cada célula devida a um choque. Além disso, o Fluo-3, embora apresente um ótimo aumento de fluorescência quando ligado a Ca^{2+} (de 45 a 200 vezes, Harkins, Kurebayashi, & Baylor, 1993), não é o mais adequado para se medir a concentração citosólica basal. Num miócito cardíaco de rato, esta concentração é da ordem de algumas centenas de nanomolares (Bassani & Bassani, 2002) e tal faixa corresponde à região onde a fluorescência emitida pelo Fluo-3 é mínima (Thomas, Tovey, Collins, Bootman, Berridge, & Lipp, 2000), ou seja, equivale a situação onde o indicador não está ligado a Ca^{2+} .

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, produzimos um sistema de microfluorimetria para o estudo da fluorescência relacionada a $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos cardíacos isolados de rato, implementamos dois métodos de análise de fluorescência diferenciados e realizamos experimentos para dois grupos celulares: longitudinal e transversal.

O sistema produzido ficou robusto, teve um custo relativamente baixo e permitiu a realização dos experimentos pretendidos. Os métodos para análise da fluorescência puderam ser validados pela concordância dos resultados experimentais da comparação entre ânodo e cátodo com resultados da literatura. A comparação entre os grupos celulares demonstrou, num dos métodos, uma diferença na fluorescência em resposta a **E** de alta intensidade quando se variou a sua direção pela primeira vez na literatura.. Uma vez que o método da média de fluorescência não apresentou esta mesma diferença, acreditamos que o método da razão de áreas apresenta uma maior sensibilidade em relação a este fenômeno, pois ele confirma as estimativas de uma lesão mais extensa feita em outro estudo. A utilização de uma técnica mais direta de medição de eletroporação, como um indicador de potencial de membrana ou um indicador de fluorescência impermeável em condições normais, pode ser capaz de elucidar esta questão. A compreensão dos principais agentes responsáveis por essas diferenças pode auxiliar na elaboração de protocolos que minimizem lesões imediatas pró-arrítmicas no coração.

7 REFERÊNCIAS

Abidor, I. G., Arakelyan, V. B., Chernomordik, L. V., Chizmadzhev, Y. A., Pastushenko, V. F., & Tarasevich, M. R. (1979). Electric Breakdown of Bilayer Lipid Membranes - I. The Main Experimental Facts and Their Qualitative Discussion. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* , 6, 37-52.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science - Taylor & Francis Group.

Allender, S., Scarborough, P., Peto, V., Rayner, M., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., et al. (2008). *European Cardiovascular Diseases Statistics*. European Heart Network.

Avitall, B., Port, S., Gal, R., McKinnie, J., Tchou, P., Jazayeri, M., et al. (1990). Automatic Implantable Cardioverter / Defibrillator Discharges and Acute Myocardial Injury. *Circulation* , 81, 1482-1487.

Bassani, R. A., & Bassani, J. W. (2002). Contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , 282, H2406-H2413.

Bassani, R. A., Lima, K. A., Gomes, P. A., Oliveira, P. X., & Bassani, J. W. (2006). Combining Stimulus Direction and Waveform for Optimization of Threshold Stimulation of Isolated Ventricular Myocytes. *Physiological Measurement* , 27 (9), 851-863.

Bennett, W. F., Sapay, N., & Tieleman, D. P. (2014). Atomistic Simulations of Pore Formation and Closure in Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* , 106, 210-219.

Bers, D. M. (2002). Cardiac Excitation-contraction Coupling. *Nature* , 415, 198-205.

Bers, D. M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (2nd edition ed.). Springer.

Bi, G. Q., Alderton, J. M., & Steinhardt, R. A. (1995). Calcium Regulated Exocytosis is Required for Cell Membrane Resealing. *J. Cell Biol.* , 131, 1747-1758.

Bingham, R. J., & Olmsted, P. D. (2010). Undulation Instability in a Bilayer Lipid Membrane due to Electric Field Interaction. *Physical Review E* , 81, 11.

Böckmann, R. A., de Groot, B. L., Kakorin, S., Neumann, E., & Grubmüller, H. (2008). Kinetics, Statistics, and Energetics of Lipid Membrane Electroporation Studied by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* , 95, 1837-1850.

Canny, J. (1986). A Computational Approach to Edge Detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* , PAMI-8 (6), 679-698.

- Cavalié, A., McDonald, T. F., Pelzer, D., & Trautwein, W. (1985). Temperature-induced transitory and steady-state changes in the calcium current of guinea pig ventricular myocytes. *European Journal of Physiology* , 405, 294-296.
- Cheek, E. R., & Fast, V. G. (2004). Nonlinear Changes of Transmembrane Potential During Electrical Shocks - Role of Membrane Electroporation. *Circulation Research* , 94, 208-214.
- Chen, C., Smye, S. W., & Robinson, M. P. (2006). Membrane Electroporation Theories: a Review. *Med Biol Eng Comput* , 44, 5-14.
- Cheng, D. K., Tung, L., & Sobie, E. A. (1999). Nonuniform Responses of Transmembrane Potential During Electric Field Stimulation of Single Cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* , 46, H351-H362.
- Dahl, C. F., Ewy, G. A., Warner, E. D., & Thomas, E. D. (1974). Myocardial Necrosis from Direct Current Countershock: Effect of paddle electrode size and Time Interval Between Discharges. *Circulation* , 50, 956-961.
- DeBruin, K. A., & Krassowska, W. (1999). Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential. *Biophysical Journal* , 77, 1213-1224.
- DeBruin, K. A., & Krassowska, W. (1999b). Modeling Electroporation in a Single Cell. II. Effects of Ions Concentrations. *Biophysical Journal* , 77, 1225-1233.
- Delemotte, L., & Tarek, M. (2012). Molecular Dynamics Simulations of Lipid Membrane Electroporation. *The Journal of Membrane Biology* , 245, 531-543.
- Donck, L. V., Pauwels, P. J., Vandeplassche, G., & Borgers, M. (1986). Isolated Rat Cardiac Myocytes as an Experimental Model to Study Calcium Overload - The Effect of Calcium Entry Blockers. *Life Sciences* , 38, 765-772.
- Fast, V. G., Cheek, E. R., Pollard, A. E., & Ideker, R. E. (2004). Effects of Electrical Shocks on Ca^{2+} and V_m in Myocyte Cultures. *Circulation Research - Journal of the American Heart Association* , 94, 1589-1597.
- Fu, Y., Zhang, G.-Q., Hao, X.-M., Wu, C.-H., Chai, Z., & Wang., S.-Q. (2005). Temperature Dependence and Thermodynamic Properties of Ca^{2+} Sparks in Rat Cardiomyocytes. *Biophysical Journal* , 89, 2533-2541.
- Fujiwara, K., Tanaka, H., Mani, H., Nakagami, T., & Takamatsu, T. (2008). Burst Emergence of Intracellular Ca^{2+} Waves Evokes Arrhythmogenic Oscillatory Depolarization via the $Na^{+}Ca^{2+}$ Exchanger Simultaneous Confocal Recording of Membrane Potential and Intracellular Ca^{2+} in the Heart. *Circulation Research* , 103, 509-518.
- Gazmuri, R. J., Weil, M. H., Bisera, J., Tang, W., Fukui, M., & McKee, D. (1996). Myocardial Dysfunction After Successful Resuscitation from Cardiac Arrest. *Crit. Care Med.* , 24, 992-1000.

Global Health Observatory (GBO). (2008). Acesso em 27 de Maio de 2014, disponível em World Health Organization: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/ncd_total_text/en/index.html

Gomes, P. A. (1997). *Aplicação de Técnicas de Engenharia no Estudo de Células Cardíacas Isoladas: Medição de $[Ca^{2+}]_i$ e Limiar de Estimulação*. Tese de doutoramento. Departamento de Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp.

Gomes, P. A., Bassani, R. A., & Bassani, J. W. (2001). Electric Field Stimulation of Cardiac Myocytes During Postnatal Development. *IEEE Trans Biomed Eng* , 48, 630-6.

Goulart, J. T., Oliveira, P. X., Bassani, J. W., & Bassani, R. A. (2012). The influence of cell dimensions on the vulnerability of ventricular myocytes to lethal injury by high-intensity electrical fields. *Brazilian Journal of Biomedical Engineering* , 28 (4), 337-345.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* , 260, 3440-3450.

Gurtovenko, A. A., & Vattulainen, I. (2007). Ion Leakage through Transient Water Pores in Protein-Free Lipid Membranes Driven by Transmembrane Ionic Charge Imbalance. *Biophysical Journal* , 92, 1878-1890.

Gurtovenko, A. A., & Vattulainen, I. (2005). Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge Imbalance: Atomistic Molecular Dynamics Study. *Journal of the American Chemical Society* , 127, 17570-17571.

Harkins, A. B., Kurebayashi, M., & Baylor, S. M. (1993). Resting Myoplasmic Free Calcium in Frog Skeletal Muscle Fibers Estimated with Fluo-3. *Biophysical Journal* , 65, 865-881.

Hibino, M., Itoh, H., & Kinoshita Jr, K. (1993). Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal* , 1789-1800.

Hibino, M., Shigemori, M., Itoh, H., Nagayama, K., & Kinoshita Jr, K. (1991). Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophysical Journal* , Volume 59: 209-220.

Jaconi, N., Bony, C., Richards, S. M., Terzic, A., Arnaudeau, S., Vassort, G., et al. (2000). Inositol 1,4,5-Trisphosphate Directs Ca^{2+} Flow between Mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum: A Role in Regulating Cardiac Autonomic Ca^{2+} Spiking. *Molecular Biology of the Cell* , 11, 1845-1858.

Jones, J. L., Jones, R. E., & Balasky, G. (1987). Microlesion Formation in Myocardial Cells by High-intensity Electric Field Stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* , 253, H480-H486.

Jones, J. L., Lipeschkin, E., Jones, R. E., & Rush, S. (1978). Response of Cultured Myocardial Cells to Countershock-type Electric Field Stimulation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* , 235, H214-H222.

- Keynes, R. D., Aidley, D. J., & Huang, C. L.-H. (2011). *Nerve and Muscle*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kinosita Jr, K., Ashikawa, I., Saita, N., Yoshimura, H., Itoh, H., Nagayama, K., et al. (1988). Electroporation of Cell Membrane Visualized Under a Pulsed-Laser Fluorescence Microscope. *Biophysical Journal* , Volume 53: 1015-1019.
- Kinosita Jr, K., Itoh, H., Ishiwata, S., Hirano, K., Nishizaka, T., & Hayakawa, T. (1991). Dual-View Microscopy with a Single Camera: Real-Time Imaging of Molecular Orientations and Calcium. *The Journal of Cell Biology* , Volume 115, Number 1: 67-73.
- Klauke, N., Smith, G., & Cooper, J. M. (2010). Regional Electroporation of Single Cardiac Myocytes in a Focused Electric Field. *Analytical Chemistry* , 82: 585-592.
- Klee, M., & Plonsey, R. (1976). Stimulation of Spheroidal Cells - The Role of Cell Shape. *IEEE - Transactions on Biomedical Engineering* , BME-23 (4), 347-354.
- Knisley, S. B., & Grant, A. O. (1995). Asymmetrical Electrically Induced Injury of Rabbit Ventricular Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* , 27, 1111-1122.
- Kockskämper, J., & Blatter, L. A. (2002). Subcellular Ca²⁺ alternans represents a novel mechanism for the generation of arrhythmogenic Ca²⁺ waves in cat atrial myocytes. *Journal of Physiology* , 545, 65-79.
- Kotnik, T., Pucihar, G., & Miklavčič, D. (2010). Induced Transmembrane Voltage and Its Correlation with Electroporation-Mediated Molecular Transport. *Journal of Membrane Biology* , 236, 3-13.
- Krauthamer, V., & Jones, J. L. (1997). Calcium Dynamics in Cultured Heart Cells Exposed to Defibrillator-type Electric Shocks. *Life Sci.* , 60, 1977-1985.
- Leontiadou, H., Mark, A. E., & Marrink, S.-J. (2007). Ion Transport across Transmembrane Pores. *Biophysical Journal* , 92, 4209-4215.
- Levine, Z. A., & Vernier, P. T. (2010). Life Cycle of an Electropore: Field-Dependent and Field-Independent Steps in Pore Creation and Annihilation. *Journal of Membrane Biology* , 236, 27-36.
- Lewis, T. J. (2003). A Model for Bilayer Membrane Electroporation Based on Resultant Electromechanical Stress. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* , 10 (5), 769-777.
- Li, H. G., Jones, D. L., Yee, R., & Klein, G. J. (1991). Defibrillation Shocks Increase Myocardial Pacing Threshold: an Intracellular Microelectrode Study. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* , 260, H1973-H1979.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Bronw, T. M., Carnethon, M., Dai, S., Simone, G. D., et al. (2010). *Heart Disease and Stroke Statistics*. Dallas: American Heart Association.

Mehrle, W., Hampp, R., & Zimmermann, U. (1989). Electric pulse induced membrane permeabilisation. Spatial orientation and kinetics of solute efflux in freely suspended and dielectrophoretically aligned plant mesophyll protoplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* , 978, 267-275.

Minta, A., Kao, J. P., & Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* , 264, 8171-8178.

Moura, S. P., Soares, G. S., Bassani, R. A., & Bassani, J. W. (Setembro de 2004). Estimulador Elétrico de Alta Potência para Experimentos Fisiológicos. *III Congresso Latino-americano de Engenharia Biomédica* , 01 , 837-840. João Pessoa, PB, Brasil.

Nature. (2014). Acesso em 21 de 08 de 2014, disponível em Nature Milestones - Light Microscopy: <http://www.nature.com/milestones/milelight/timeline.html>

Neu, J. C., & Krassowska, W. (1999). Asymptotic Model of Electroporation. *Physical review E* , 59 (3), 3471-3482.

Nikolski, V. P., & Efimov, I. R. (2005). Electroporation of the Heart. *Europace* , 7, S146-S154.

Oliveira, P. X. (2004). *Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato - Dissertação de Mestrado*. Campinas: UNICAMP.

Oliveira, P. X. (2008). *Mecanismos Envolvidos na Depressão Contrátil e Lesão de Miócitos Cardíacos Submetidos a Campos Elétricos de Alta Intensidade - Tese de Doutorado*. Campinas: UNICAMP.

Oliveira, P. X., Bassani, R. A., & Bassani, J. W. (2008b). Lethal Effect of Electric Fields on Isolated Ventricular Myocytes. *IEEE transactions on Biomedical Engineering* , 55, 2635-2642.

Penna, L. B., & Bassani, R. A. (2010). Increased Spontaneous Activity and Lower Inotropic Response to Catecholamines in Ventricular Myocytes from Footshock-stressed Rats. *Luxembourg. Print* , 13, 73-82.

Quinn, P. J. (2002). *Plasma membrane phospholipids asymmetry* (Vol. 36). Subcellular Biochemistry.

Rocco, M. B., Barry, J., Campbell, S., Nabel, E., Cook, E. F., Goldman, L., et al. (1987). Circadian Variation of Transient Myocardial Ischemia in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation - Journal of the American Heart Association* , 75, 395-400.

Schwartz, P. J., Billman, G. E., & Stone, H. L. (1984). Autonomic Mechanisms in Ventricular Fibrillation Induced by Myocardial Ischemia during Exercise in Dogs with Healed Myocardial Infarction. An Experimental Preparation for Sudden Cardiac Death. *Circulation - Journal of the American Heart Association* , 69, 790-800.

Scriven, D. R., Asghari, P., Schulson, M. N., & Moore, E. D. (2010). Analysis of Cav1.2 and Ryanodine Receptor Clusters in Rat Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal* , 99, 3923-3929.

- Sharma, V., Susil, R. C., & Tung, L. (2005). Paradoxical Loss of Excitation with High Intensity Pulses during Electric Field Stimulation of Single Cardiac Cells. *Biophysical Journal* , 88, 3038-3049.
- Silverthorn, D. U. (2009). *Human Physiology: An Integrated Approach*. Pearson.
- Soares, G. S. (2003). *Comprometimento Contrátil do Tecido Cardíaco Isolado Após Estimulação com Campo Elétrico de Alta Intensidade - Tese de Mestrado*. Campinas: Departamento de Engenharia Biomédica - Faculdade de Engenharia Elétrica - Unicamp.
- Tang, W., Weil, M. H., Sun, S., Gazmuri, R. J., & Bisera, J. (1993). Progressive Myocardial Dysfunction After Cardiac Resuscitation. *Crit. Care Med.* , 21, 1046-1050.
- Tarek, M. (2005). Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal* , 88, 4045-4053.
- Teruel, M. N., & Meyer, T. (1997). Electroporation-Induced Formation of Individual Calcium Entry Sites in the Cell Body and Processes of Adherent Cells. *Biophysical journal* , 73, 1785-1796.
- Thomas, D., Tovey, S. C., Collins, T. J., Bootman, M. D., Berridge, M. J., & Lipp, P. (2000). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* , 28 (4), 213-223.
- Tieleman, D. P. (2004). The Molecular Basis of Electroporation. *BMC Biochemistry* , 5, 10.
- Troiano, G. C., Stebe, K. J., Raphael, R. M., & Tung, L. (1999). The Effects of Gramicidin on Electroporation of Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* , 76, 3150-3157.
- Tsai, M., Tang, W., & Sun, S. (2009). Individual Effect of Components of Defibrillation Waveform on the Contractile Function and Intracellular Calcium Dynamics of Cardiomyocytes. *Crit. Care Med.* , 37, 2394-2401.
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* , 19, 2396-2404.
- Tsong, T. Y. (1991). Electroporation of Cell Membranes. *Biophysical Journal* , 60, 297-306.
- Tung, L. (1996). Detrimental Effects of Electrical Fields on Cardiac Muscle. *Proc. IEEE* , 84, 366-378.
- Tung, L., Tovar, O., Neunlist, M., Jain, S. K., & O'Neill, R. J. (1994). Effects of Strong Electrical Shock on Cardiac Muscle Tissue. *Ann. NY Acad. Sci.* , 720, 160-175.
- Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. (1996b). Theory of Electroporation: a Review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* , 41, 135-160.

World Health Organization. (2014). *World Health Statistics 2014 - A Wealth of Information on Global Public Health*. Geneva: WHO Press.

Xie, J., Weil, M. H., Sun, S., Tang, W., Sato, Y., Jin, X., et al. (1997). High-energy Defibrillation Increases the Severity of Postresuscitation Myocardial Dysfunction. *Circulation* , 96, 683-688.

Yabe, S., Smith, W. M., Daubert, J. P., Wolf, P. D., Rollins, D. L., & Ideker, R. E. (1990). Conduction Disturbances Caused by High Current Density Electric Fields. *Circ. Res.* , 66, 1191-1203.

Zeiss. (2014). *Education in Microscopy and Digital Imaging*. Acesso em 30 de 05 de 2014, disponível em Zeiss: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/lightsources/tungstenhalogen.html>

Zeiss. (2014b). *Filter Assistant*. Acesso em 8 de Junho de 2014, disponível em Zeiss Microscopy Online Shop: <https://www.microshop.zeiss.com/index.php?s=10594110394bf0d&l=en&p=us&f=f&a=v&b=f&id=489046-9901-000&o=>

Zeiss. (2014d). *Introduction to Fluorescence Microscopy*. Acesso em 21 de 08 de 2014, disponível em Education in Microscopy and Digital Imaging: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html>

Zeiss. (2014c). *Objective Assistant*. Acesso em 1 de Junho de 2014, disponível em Zeiss Microscopy Online Shop: <https://www.microshop.zeiss.com/index.php?s=1020426688c3601&l=en&p=de&f=o&a=v&m=s&id=440350-9903-000&o=&st=1>

Zimmermann, U., Pilwat, G., Beckers, F., & Riemann, F. (1976). Effects of External Electrical Fields on Cell Membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* , 3, 58-83.

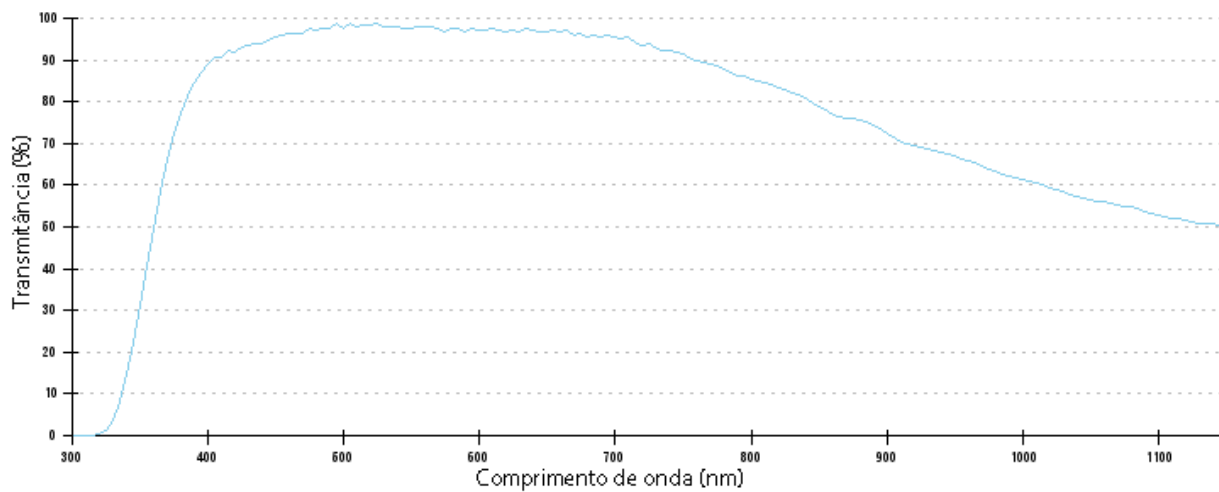
ANEXO A – CURVA DE TRANSMITÂNCIA DE LENTE OBJETIVA 40X

Figura A.1: Curva de transmitância de lente objetiva 40x/0.75 (modificado de Zeiss, 2014c).



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos" (protocolo nº 3282-1), sob a responsabilidade de Dra. Rosana Almada Bassani / Prof. Dr. José W.M. Bassani / Natalia Ferreira Oshyama / Elizângela Souto Oliveira / Pedro Xavier de Oliveira / Marcelo Zoccoler / Fabiana Emanuel Omuro, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **25 de fevereiro de 2014**.

Campinas, 25 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Varição da [Ca²⁺]_i de miócitos cardíacos isolados submetidos a campos elétricos de alta intensidade" (protocolo nº 3282-1(C)), sob a responsabilidade de Dr. Pedro Xavier de Oliveira / Marcelo Zoccoler, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 25 de fevereiro de 2014.

Campinas, 25 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva