

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE
COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor

Pedro Xavier de Oliveira

Campinas, junho de 2004
SP – Brasil

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE
COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Campo Elétrico Letal e Variação do Potencial Transmembrana em Miócitos Ventriculares de Rato

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani
Profa. Dra. Alice Teixeira Ferreira
Prof. Dr. Reinaldo Wilson Vieira
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa

Autor: Pedro Xavier de Oliveira

Orientador: Prof. José Wilson Magalhães Bassani

Co-Orientadora: Prof. Dra. Rosana Almada Bassani

Curso: Engenharia Elétrica

Área de concentração: Engenharia Biomédica

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

Campinas, junho de 2004
SP – Brasil

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

OL4c	Oliveira, Pedro Xavier de Campo elétrico letal e variação do potencial transmembrana em miócitos ventriculares de rato / Pedro Xavier de Oliveira. --Campinas, SP: [s.n.], 2004. Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana Almada Bassani. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. 1. Desfibrilação. 2. Campos elétricos. 3. Coração - ventrículos. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.
------	---

Resumo

A desfibrilação é a única terapia conhecida para reverter o quadro de fibrilação ventricular. Entretanto, após a desfibrilação, miócitos cardíacos podem ser lesados, e, como consequência, a eficiência contrátil do coração é reduzida. Neste trabalho desenvolvemos instrumentação específica para o estudo do efeito letal de campos elétricos de alta intensidade sobre miócitos cardíacos isolados. O campo elétrico limiar de estimulação (E_T) foi de $7,24 \pm 0,27$ V/cm, para células orientadas na direção transversal (Transv, $n=17$) à direção de aplicação do campo elétrico, cerca de 2 vezes maior do que em células orientadas na direção longitudinal (Long, $3,25 \pm 0,26$ V/cm, $n=13$; $p < 0,001$). Quando estimamos a variação máxima do potencial transmembrana (ΔV_{max}) no limiar com um modelo eletromagnético, os valores foram praticamente iguais ($18,98 \pm 0,78$ mV e $20,35 \pm 1,51$ mV para células Transv e Long, respectivamente). Para 50% de letalidade, o campo foi de 137,5 e 67,63 V/cm para células Transv e Long, respectivamente. Estimando a ΔV_{max} induzida por campos com 50% de probabilidade de letalidade, obtivemos valores de 355,2 mV e 413,5 mV, para células Transv e Long, respectivamente. Constatamos que um campo de aproximadamente 20 vezes o limiar de estimulação foi altamente letal, independente da direção de sua aplicação. Assim, se na desfibrilação fosse possível atingir preferencialmente células Long, poder-se-ia utilizar campos de menor intensidade, o que minimizaria o efeito letal dos campos desfibrilatórios, ou seja, a estimulação desfibrilatória poderia ser otimizada.

Abstract

Transthoracic electrical stimulation is the only therapy available for cardiac fibrillation. However, this kind of stimulation may cause injury to cardiac myocytes, which impairs cardiac contractile efficiency. In this study, we developed specific instrumentation to analyze the lethal effect of high intensity electric fields on isolated rat cardiac myocytes. The threshold stimulatory electric field (E_T) was 7.24 ± 0.27 V/cm for cells oriented transversally with respect to the direction of the field application (Transv, $n= 17$), which was 2-fold greater than for longitudinally-oriented cells (Long: 3.25 ± 0.26 V/cm, $n=13$; $p < 0.001$). However, the estimated maximal variation of transmembrane potential (ΔV_{max}) was similar for both directions (18.98 ± 0.78 mV and 20.35 ± 1.51 mV for Transv and Long cells, respectively). For a 50% lethality probability, electric field was 137.5 and 67.63 V/cm for Transv and Long cells, respectively. ΔV_{max} associated with 50% lethality was 355.2 and 413.5 mV for Transv and Long cells, respectively. Thus, an electrical field of approximately 20 times the stimulation threshold was lethal, independently of the direction of field application. Defibrillation could be optimized if transthoracic stimulation could be preferentially targeted to Long cells, and by using fields of lower amplitude could minimize electrical field lethal effects.

Apoio

Este trabalho teve o apoio imprescindível da Fapesp (Proc.: 00/03833 – 3, bolsa de iniciação científica) e do Cnpq (Proc.: 132724/2004-9, bolsa de mestrado).

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram na execução deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica, em especial aos professores José Wilson Magalhães Bassani e Rosana Almada Bassani pela orientação, apoio e competência, imprescindíveis ao desenvolvimento da tese.

Aos secretários, engenheiros, técnicos e estagiários do Departamento de Engenharia Biomédica e do Centro de Engenharia Biomédica, em especial às secretárias Nirlei Vitareli Souza e Marlene Caumo dos Santos, ao engenheiro Sérgio Paulo Moura, aos técnicos Eugênio Carrara, Rogério Toledo, Elisângela S. Oliveira, Mauro Sergio Martinazo, e Márcia de Almeida Queiroz, pelo apoio técnico completo e eficiente.

Aos alunos e ex-alunos, em especial a Rafael de Almeida Ricardo, pela divisão da bancada de trabalho, paciência, e amizade.

Agradeço principalmente a minha mãe, Antônia, e a Deus por acreditarem em mim.

Índice

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	01
Capítulo 2 – OBJETIVOS	12
Capítulo 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 – ANIMAIS	13
3.2 – MIÓCITOS VENTRICULARES	13
3.3 – SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	13
3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS	14
3.5 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	22
3.6 – PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	30
Capítulo 4 – RESULTADOS	32
4.1 – SISTEMA DE MICROSCOPIA	32
4.2 – MEDIÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE PERFUSÃO	33
4.3 – CAMPO ELÉTRICO LETAL EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS	34
4.4 – INFLUÊNCIA DA $[Ca^{2+}]_o$	43
Capítulo 5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	44
5.1 – SISTEMA DE MICROSCOPIA	44
5.2 – MEDIÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE PERFUSÃO	44
5.3 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS	45
5.4 – RESUMO E CONCLUSÕES	53
Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE - A	60

Lista de Abreviaturas

2a - Eixo menor da célula

2c - Eixo maior da célula

AEC - Acoplamento excitação contração

$[Ca]_i$ - Concentração intracelular de Ca^{2+}

$[Ca]_o$ - Concentração extracelular de Ca^{2+}

CCD - *Charge Coupled Device*

CEB - Centro de Engenharia Biomédica

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

DBV - Detector de borda de sinal de vídeo

ΔV_m - Variação do potencial transmembrana

ΔV_{m50} - Variação do potencial transmembrana máxima correspondente a 50% de letalidade média

ΔV_{max} - Variação máxima do potencial transmembrana

ΔV_T - Variação máxima do potencial transmembrana no limiar de estimulação

E - Campo elétrico aplicado

EAP - Estimulador de alta potência

EBP - Estimulador de baixa potência

EL50 - Campo elétrico correspondente a 50% de letalidade média

E_{medido} - Campo elétrico medido

E_T - Campo elétrico limiar de estimulação

IC95% - Intervalo de confiança para 95%

FV - Fibrilação ventricular

HS - “Coeficiente de Hill” da curva sigmóide

Long - Grupo de células nas quais o campo elétrico foi aplicado na direção longitudinal ao eixo maior da célula.

LED - *Light emitting diode*

MF - Miofilamentos

NCX - Troca Na^+/Ca^{2+}

OSC - Osciloscópio digital

PA - Potencial de ação

RS - Retículo sarcoplasmático

SAD - Sistema de aquisição de dados

Transv - Grupo de células nas quais o campo elétrico foi aplicado na direção transversal ao eixo maior da célula.

VCR - Aparelho gravador de vídeo cassete

V_m - Potencial transmembrana

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O coração é um órgão muscular cuja função é bombear o sangue para as circulações pulmonar e sistêmica. É composto por quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, separadas por septos. A comunicação entre os átrios e os ventrículos é feita através de válvulas que abrem e fecham de acordo com o gradiente de pressão.

A eficiência do bombeamento cardíaco requer atividade rítmica e coordenada de átrios e ventrículos, segundo um padrão seqüencial de excitação e contração. A atividade contrátil das células do coração é iniciada por uma onda de ativação elétrica, o potencial de ação (PA), que consiste de uma variação rápida do potencial transmembrana (V_m) a partir do valor de repouso (cerca de -85 mV). Durante o PA, ocorre despolarização da membrana e rápida reversão de V_m (que pode atingir um valor máximo de 20 a 40 mV), seguidas de retorno ao potencial de repouso.

As células de diferentes regiões do coração apresentam PAs com formas e cursos temporais diferentes. O PA típico dos miócitos ventriculares pode ser dividido em cinco fases (Figura 1.1): 1) fase 0: corresponde a uma rápida despolarização, devida ao aumento rápido da condutância da membrana ao Na^+ , com reversão de V_m ; 2) fase 1: repolarização inicial para próximo de zero mV; 3) fase 2: platô em torno de zero mV; 4) fase 3: repolarização final, durante a qual V_m retorna para o valor de repouso; 5) fase 4: fase diastólica (potencial de repouso), que dura até a ocorrência de um novo PA (Garcia, 1997).

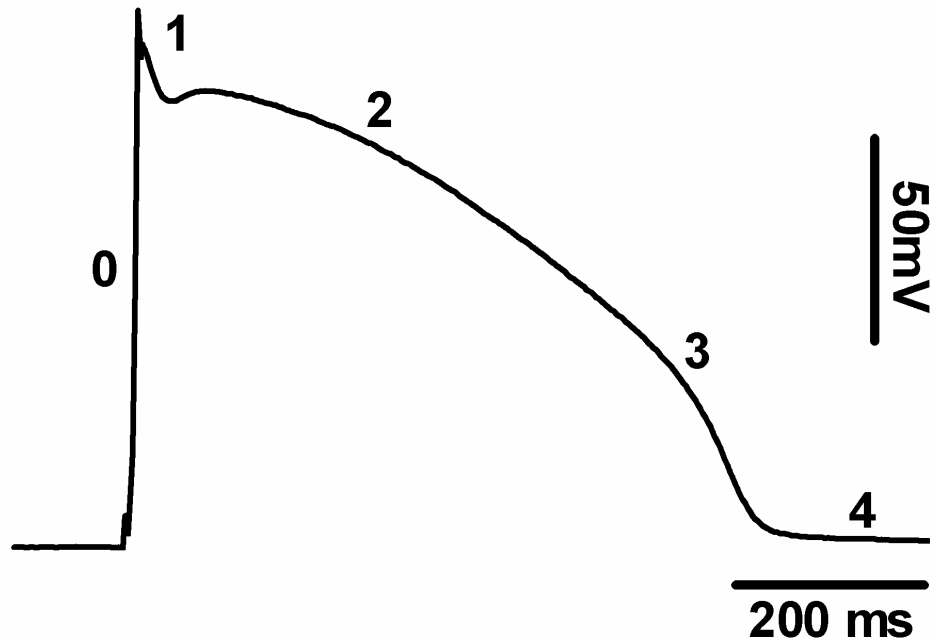


Figura 1.1: Potencial de ação típico de uma célula cardíaca ventricular com suas respectivas fases: fase 0, despolarização rápida; fase 1, repolarização inicial; fase 2, platô; fase 3, repolarização final; fase 4, potencial de repouso. Modificado de Bers (2001).

O PA é disparado quando a impedância da membrana cai devido à abertura de canais de Na^+ dependentes de tensão elétrica, que se abrem quando V_m atinge um valor crítico, o potencial limiar, menos negativo que o potencial de repouso. No coração, a variação de V_m na direção do potencial limiar ocorre devido à estimulação elétrica, fisiológica ou não, da célula. Uma vez disparado, o PA se propaga por toda a célula, por meio do acoplamento espacial da corrente elétrica (teoria dos circuitos locais, Aidley, 1989). Embora as células cardíacas sejam independentemente excitáveis, elas são interligadas intimamente por estruturas juncionais complexas (discos intercalados), onde se encontram conexões de baixa resistência (*gap junctions*, Garcia, 1997). Assim, a íntima ligação elétrica entre células cardíacas permite que a ativação elétrica de uma célula se propague para outra por meio do acoplamento espacial de corrente através dessas junções.

O conjunto de eventos desde a ativação elétrica das células cardíacas até o desencadeamento da atividade contrátil é denominado acoplamento excitação-contração (AEC). A atividade elétrica é o fenômeno que desencadeia a atividade contrátil, e, portanto, sempre a precede (Figura 1.2).

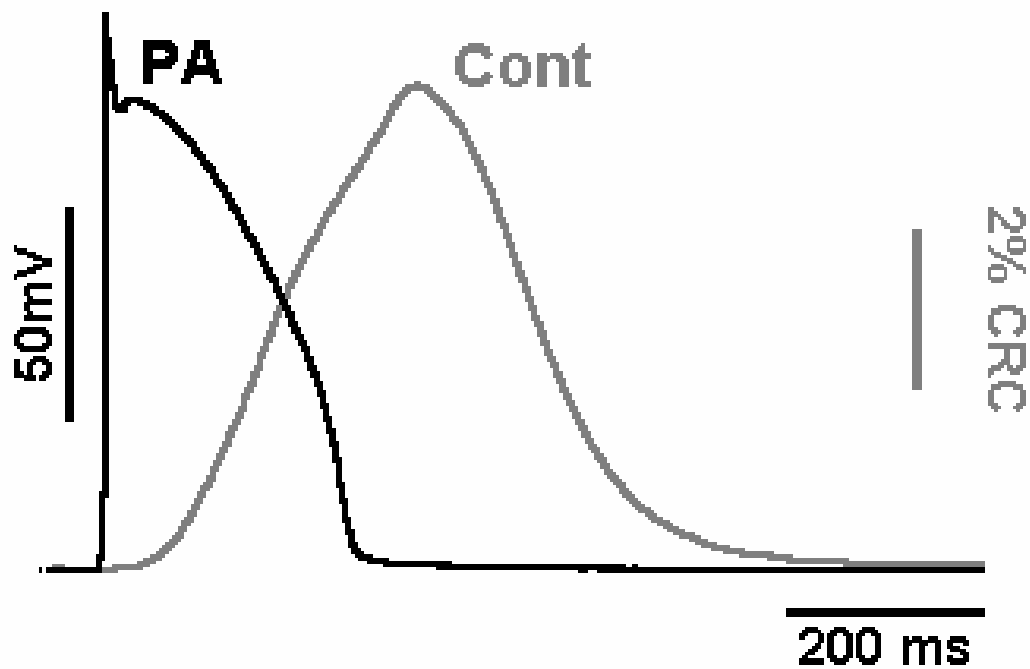
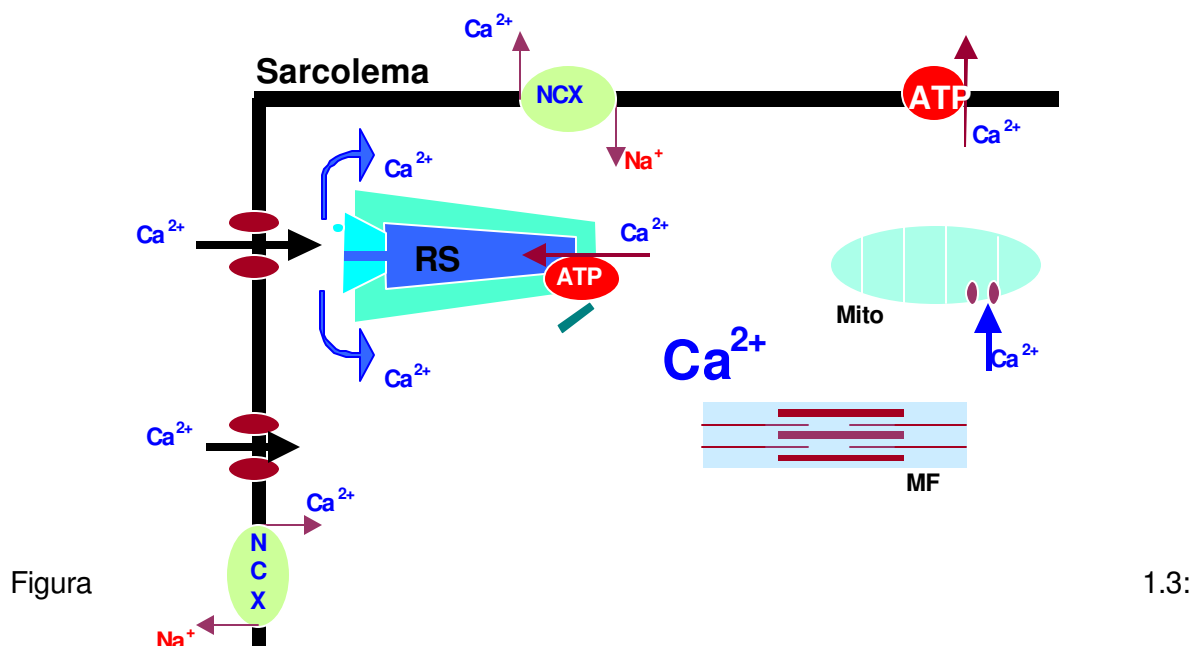


Figura 1.2: Relação temporal entre o potencial de ação (PA) e a contração (Cont) em um miócito ventricular de coelho. A contração (encurtamento sem carga externa) está expressa como porcentagem do comprimento de repouso da célula (CRC). Modificado de Bers (2001).

A Figura 1.3 ilustra os principais mecanismos celulares participantes no AEC e no relaxamento. Durante o PA, Ca^{2+} entra na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de tensão elétrica presentes no sarcolema (fase 2 do PA). O Ca^{2+} que entra, além de ativar diretamente os miofilamentos (MF), interage com os sítios de ligação de Ca^{2+} dos canais de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), provocando a abertura destes canais e liberação de grande quantidade deste íon. A concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) eleva-se de 100 nM para aproximadamente 1 μM . Quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, a ligação do íon aos miofilamentos gera o processo de desenvolvimento de força e encurtamento (Bers, 2001). Para que o relaxamento ocorra, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve ser reduzida. A maior parte do íon, a mesma que foi liberada pelo RS, é recaptada para o RS via ATPase de Ca^{2+} do RS (esta recarga é fundamental para a manutenção da amplitude das contrações em regime permanente), e parte é

transportada para fora da célula pelo mecanismo de troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX). Este último é responsável pela extrusão da maior parte do Ca^{2+} que entra na célula via canais de Ca^{2+} do sarcolema (Bassani *et al.*, 1992, 1994; Trafford *et al.*, 1997; Bers, 2001).



Principais mecanismos participantes no acoplamento excitação-contração e relaxamento da célula cardíaca: retículo sarcoplasmático (RS); mitocôndria (Mito); troca sódio-cálcio (NCX); ATPase de Ca^{2+} (ATP); miofilamentos (MF).

A recaptção de Ca^{2+} pelo RS e a extrusão de Ca^{2+} via NCX são considerados os mecanismos rápidos para a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. No ventrículo de rato, a ATPase de Ca^{2+} do RS é responsável por ~90% do total de Ca^{2+} transportado durante o relaxamento, enquanto que a NCX transporta cerca de 7%, e 2% é transportado por cada um dos chamados mecanismos lentos, o *uniporter* mitocondrial de Ca^{2+} e a ATPase de Ca^{2+} do sarcolema (Bassani *et al.*, 1992, 1994; Bassani *et al.*, 2002).

O coração pode apresentar alterações do seu ritmo cardíaco normal, as chamadas arritmias, causadas, por exemplo, por doenças coronarianas, doença de Chagas, doenças congênitas do sistema cardiovascular, ou eventos como

acidentes traumáticos e choques elétricos. As arritmias afetam a eficiência da ação bombeadora do coração, podendo ser letais (Opie, 1998; American Heart Association, 2004). Dentre as arritmias cardíacas, as ventriculares representam um maior risco ao paciente, pois interferem diretamente no volume de sangue ejetado para as circulações sistêmica e pulmonar e, portanto, na nutrição e oxigenação de todas as células do organismo, incluindo o próprio coração. A fibrilação ventricular (FV, ativação caótica e assíncrona das células ventriculares) é a arritmia responsável pela maioria das mortes súbitas em adultos. Nos Estados Unidos da América, a FV é a causa da maior parte das 340.000 mortes que ocorrem por ano em indivíduos portadores de doenças coronarianas (American Heart Association, 2004).

A FV deve ser tratada em regime de urgência com estimulação transtorácica por campos elétricos de alta intensidade, ou seja, por desfibrilação, a única terapia conhecida para reverter este quadro clínico. A probabilidade de óbito é de 50%, se a arritmia é tratada nos primeiros 5 minutos, aumentando 10% a cada minuto sem tratamento. Poucas tentativas de desfibrilação têm êxito após 10 minutos (Eisenberg *et al.*, 1980; Larsen *et al.*, 1993).

A forma de onda mais utilizada nos choques desfibrilatórios é a senóide superamortecida com duração de 10 ms e picos de corrente que variam de 30 a 40 A, dependendo da impedância transtorácica (25 a 125 Ω) e da energia aplicada (200 a 360 J para a desfibrilação externa, Tacker & Gueddes, 1996). O pico de tensão elétrica é da ordem de kilovolts (kV) e o campo elétrico perto dos eletrodos (pás) do desfibrilador chega a valores acima de 100 V/cm (Yabe *et al.*, 1990), o que gera gradientes de potencial cerca de 20 vezes maiores que o limiar estimulatório (Tang *et al.*, 1992). O campo elétrico suficiente para estimular as células do tecido cardíaco durante a desfibrilação varia de 4 a 7 V/cm (Ideker *et al.*, 1991).

Os campos elétricos desfibrilatórios precisam ser altos (maiores que 80V/cm) porque a não homogeneidade do tecido cardíaco leva à geração de gradientes de potencial elétrico (campos elétricos) não uniformes na estrutura cardíaca. Há células que ficam submetidas a campos elétricos altos e outras que

ficam submetidas a campos elétricos baixos (menores que 10V/cm), dependendo da sua localização e orientação. Assim, utilizam-se campos elétricos altos para recrutar o maior número de células durante o processo desfibrilatório, o que aumenta a sua eficiência. Apesar disto, Weaver *et al.*, (1982), comparando os efeitos do choque elétrico inicial de 175 e 320 J em 249 pacientes com FV, relataram que a aplicação de choques desfibrilatórios iniciais com energia de 175 J é mais segura e eficiente.

Realmente, choques desfibrilatórios causam efeitos indesejados sobre o coração, como depressão da função hemodinâmica (Tang *et al.*, 1993; Gazmuri *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1997), necrose do tecido (Dahl, *et al.*, 1974; Avitall, *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1997), distúrbios na condução do PA (Yabe *et al.*, 1990), e outras alterações eletrofisiológicas (Dahl, *et al.*, 1974; Li *et al.*, 1991). Um dos fenômenos celulares relacionados com esses efeitos indesejados e lesão celular denomina-se eletroporação ou eletropermeabilização da membrana celular, causada por campos elétricos de alta intensidade (Krauthamer & Jones, 1997; Cheng *et al.*, 1999). A eletroporação acaba tornando mais difícil uma nova desfibrilação, reduz a eficiência contrátil (Malmivuo & Plonsey, 1995) e gera um “período refratário” no qual a preparação deixa de responder aos estímulos (Yabe *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991).

Considera-se que a eletroporação consiste na desestabilização da bicamada de fosfolipídios da membrana plasmática (a qual, em condições normais, é impermeável a íons e moléculas polares), tornando-a permeável. A desestabilização da bicamada de fosfolipídios acaba por formar poros hidrofílicos, que permitem a passagem de íons e moléculas polares. Os poros hidrofílicos são formados a partir de poros hidrofóbicos (Figura 1.4) já existentes, que não permitem a passagem de partículas polares.

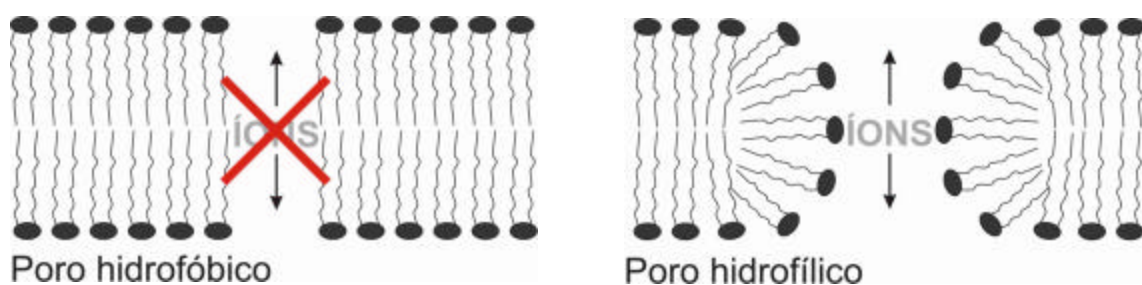


Figura 1.4: Poros da membrana plasmática, dos tipos hidrofóbico (que não permite a passagem de íons) e hidrofílico (que permite a passagem de íons).

Os poros hidrofóbicos, que existem na membrana celular à temperatura ambiente, são formados e desfeitos espontaneamente por movimento térmico das moléculas de fosfolípide na matriz lipídica, e “flutuam” na mesma (Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a). A formação de um poro hidrofílico a partir de um poro hidrofóbico está condicionada, contudo, à transposição de uma barreira de energia. O poro hidrofóbico transforma-se em um poro hidrofílico quando excede um tamanho crítico (Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; Smith *et al.*, 2004), havendo reorientação das moléculas lipídicas, cujas cabeças polares passam a formar a parte interna do poro (Weaver & Chizmadzhev, 1996a). Mas o aumento do tamanho do poro hidrofóbico *per se* é associado com aumento da energia livre do sistema. Se a energia livre do sistema atingir um valor crítico pela agitação térmica da matriz lipídica, a energia livre pode diminuir com a expansão do poro e reorganização espacial dos fosfolípides, que passam a se orientar transversalmente ao plano da membrana e dirigir a porção polar de suas moléculas para o interior do poro, formando poro hidrofílico (Figura 1.4, Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b).

Entretanto, outra maneira de se fornecer energia para a formação do poro hidrofílico é submeter a membrana a uma grande diferença de potencial, pela aplicação de campos elétricos de alta intensidade (Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; DeBruin & Krassowska, 1999). O gradiente de potencial formado na membrana fornece energia aos dipolos elétricos das moléculas de fosfolípides, diminuindo assim a barreira energética necessária para a transformação do poro hidrofóbico em hidrofílico (Figura 1.5, Weaver 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a). Os valores de V_m que permitem a formação de poros hidrofílicos variam

numa faixa de 150 mV a 1V, dependendo de algumas propriedades da membrana, principalmente sua espessura (Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999).

Após a retirada do campo, ainda há uma expansão de poros hidrofílicos, atribuída ao aquecimento local causado pela corrente de íons que passa por estes poros (Tsong, 1991). Todo o processo, desde a abertura dos poros hidrofílicos até seu fechamento, demora de segundos a minutos, para pulsos estimulatórios com duração na faixa de μ s a ms (Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999). Em muitos casos, os poros formados se desfazem espontaneamente (Tsong, 1991). No entanto, a eletroporação pode ser irreversível. Quanto maior é a variação do V_m (ΔV_m), maior é a probabilidade da abertura de poros hidrofílicos, e maiores são os seus raios. Assim, como os poros tendem a migrar para a região de maior potencial, eles se fundem, formando um grande poro estável nessa região (Freeman *et al*, 1994).

Em células cardíacas, a eletroporação pode ser causada pela aplicação de tensão elétrica na faixa de 200 a 800 mV, na forma de pulsos retangulares com duração de 5 ou 10 ms. Este fenômeno não é impedido pela presença de bloqueadores de canais de Na^+ (tetrodotoxina, Tovar & Tung, 1992), de K^+ (4-aminopiridina, tetraetilamônio e Ba^{+2} , Tovar & Tung, 1992; Cheek & Fast, 2004) e de Ca^{+2} (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Tovar & Tung, 1992). A eletroporação, caracterizada pelo aumento mantido da condutância global da membrana celular, pode ocorrer em resposta a estímulos com duração de 5-10 ms que geram a ΔV_m de 300-400 mV (O'Neil & Tung, 1991; Tsong, 1991).

Acredita-se que a lesão irreversível de células cardíacas se deva principalmente ao aumento do influxo de íons Ca^{2+} através dos poros não seletivos (Tung *et al*, 1994; Krauthamer & Jones, 1998). Krisley & Grant (1995) observaram que a presença de Ca^{2+} no meio externo é indispensável para que o miócito desenvolva uma contração irreversível em resposta a estimulação elétrica de alta intensidade. É importante lembrar que a sobrecarga de Ca^{2+} pode gerar atividade espontânea em miócitos (fonte potencial de arritmias) e levar à morte celular (Bassani *et al.*, 1997; Bers, 2001; Bassani & Bassani, 2003).

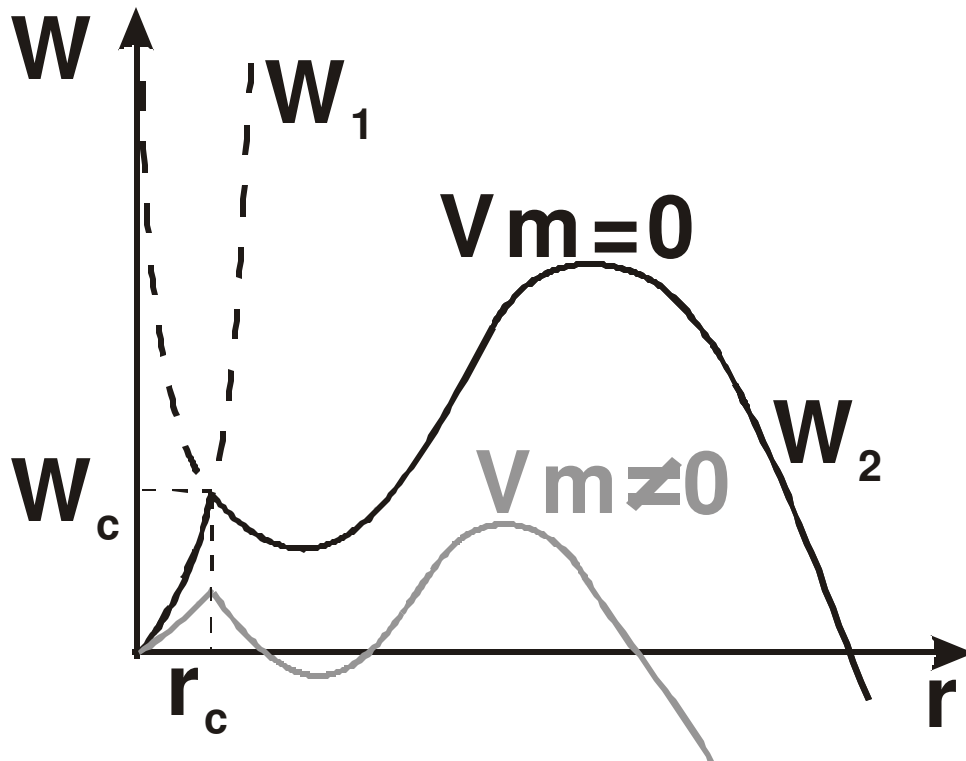


Figura 1.5: Energia livre (W) dos poros hidrofóbicos (W_1) e hidrofílicos (W_2) em relação ao raio dos poros (r) e o potencial transmembrana (V_m). W_c é a barreira de energia que se opõe à formação do poro hidrofílico, e r_c é o raio crítico para conversão do poro de hidrofóbico em hidrofílico. A figura apresenta dados qualitativos. Modificado de Weaver & Chizmadzhev (1996a).

O fenômeno da eletroporação depende de V_m , e a ΔV_m depende de fatores como a amplitude, a direção do campo elétrico aplicado, e a geometria celular (Klee & Plonsey, 1976; Lima, 1999; Gomes *et al.*, 2001). Assim, um determinado valor de campo elétrico pode causar uma grande ΔV_m em células cardíacas de um determinado tipo, ou uma pequena ΔV_m em células cardíacas de outro tipo. Isto pode ocorrer mesmo em animais da mesma espécie, como por exemplo, entre as células de coração de ratos adultos e neonatos (Gomes *et al.*, 2001).

Knisley & Grant (1995) observaram que campos elétricos da ordem de 100 V/cm, aplicados na direção longitudinal com relação ao eixo maior de células ventriculares de coelho, causam lesão celular irreversível (hipercontração), que se

inicia no lado da célula voltado para o anodo. Por outro lado, se este mesmo campo for aplicado na direção transversal, nada acontece com a célula.

Jones *et al.* (1978; 1987), estudando cultura de células miocárdicas de aves, observaram que campos estimulatórios acima de 50 V/cm levam a taquiarritmia e, a partir de 83,7 V/cm, geram hipercontratura seguida de depressão contrátil e despolarização persistente. Pulsos de 100 a 200 V/cm causam microlesões temporárias de 45-65 Å na membrana celular. Em outros experimentos, utilizando microscopia eletrônica e choques de 200 V/cm, Jones *et al.* (1980) encontraram danos estruturais em mitocôndrias, RS e miofibrilas. Em preparação semelhante, Krauthamer & Jones (1997) observaram que pulsos a partir de 41 V/cm geram aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e despolarização, mantidos estáveis por um longo período.

Cheng *et al.* (1999) observaram, em miócitos cardíacos de cobaia carregados com um indicador sensível a potencial elétrico, que campos maiores que 64 V/cm ($\Delta V_m \sim 400$ mV) sempre causam hipercontratura da célula. Em cultura de células cardíacas de rato, Cheek & Fast (2004) relataram que a aplicação de campos elétricos maiores que 15 V/cm causava despolarização diastólica da membrana, campos maiores que 20 V/cm induziam extra-sístoles, e campos acima de 23 V/cm tornavam a membrana permeável ao indicador fluorescente iodeto de propídio. De acordo com estes autores, eletroporação acontecia a partir de uma ΔV_m de 200 mV.

Em contrapartida aos efeitos danosos da estimulação por campos elétricos de alta intensidade até aqui descritos, Al-Kadra *et al.* (2000) observaram que a aplicação de campos elétricos de alta intensidade (3x o limiar de desfibrilação) a corações de coelho *in vitro* inibe a indução de fibrilação. Estes autores, assim como Knisley *et al.* (1999), propuseram que o fenômeno da eletroporação depende do gradiente de campo elétrico e da heterogeneidade da estrutura cardíaca.

Apesar dos efeitos deletérios em células cardíacas, a aplicação de campos elétricos de alta intensidade é a única terapia conhecida para reverter a fibrilação ventricular, que, se não tratada rapidamente, pode ser letal. Assim, é de grande

importância conhecer os valores de campos elétricos e de ΔV_m que são letais às células miocárdicas, para tornar possível a otimização do processo desfibrilatório, mas esses valores não estão claros (Jones & Tovar, 1996).

Neste trabalho determinamos quantitativamente os valores de campos elétricos letais em células cardíacas isoladas e, utilizando modelo baseado na teoria eletromagnética, calculamos ΔV_m de acordo com os parâmetros geométricos das células e campo elétrico externo aplicado.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

1. Desenvolver instrumentação específica para estimulação de miócitos ventriculares de ratos por campos elétricos de alta intensidade conhecidos.
2. Desenvolver metodologia para o estudo do efeito letal de campos elétricos de alta intensidade sobre miócitos ventriculares de ratos.
3. Levantar as curvas de letalidade em função do campo elétrico aplicado e estimar a variação do potencial transmembrana associada a campos letais, em miócitos ventriculares de ratos.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS

Foram usados ratos Wistar adultos de ambos os sexos, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e do Biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB/UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, recebendo água e ração “*ad libitum*”, em regime de iluminação de 12 horas. Os animais não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

O protocolo experimental adotado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – Instituto de Biologia – UNICAMP (protocolo: 633-1).

3.2 – MIÓCITOS VENTRICULARES

Os miócitos ventriculares foram isolados por digestão enzimática do coração, conforme descrito por Bassani *et al.* (1992) e Bassani & Bassani (2002). Resumidamente, o coração foi perfundido a 37 °C em sistema de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit sem cálcio, por 5 min. Em seguida, o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 0,2-0,7 mg/ml de colagenase 1 (Worthington Biochem.) por 12 – 20 min. Procedeu-se então a perfusão com solução de Tyrode sem Ca^{2+} por 2 min. Em seguida, os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços, que foram agitados na mesma solução de Tyrode, para dissociação das células. A suspensão de células foi submetida a repetidas lavagens, com aumento gradual da concentração extracelular de cálcio para 1 mM.

3.3 – SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

A solução utilizada nos experimentos foi a solução de Tyrode modificada, com a seguinte composição em mM: 140 NaCl; 6 KCl; 1,5 MgCl_2 ; 5 HEPES (ácido

hidroxietilpiperazina – N''–2 etanosulfônico); 11 glicose; 1 CaCl_2 ; pH ajustado com NaOH para 7,4 a 23° C. Na solução sem cálcio, adicionou-se 1 mM de EGTA (ácido etilenoglicol tetracético), e o CaCl_2 foi substituído de modo equimolar por MgCl_2 .

Para isolamento de células foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: 115 NaCl; 4,6 KCl; 1,2 KH_2PO_4 ; 2,4 MgSO_4 ; 25 NaHCO_3 ; 11,1 glicose; pH 7.4 sob borbulhamento com 95% O_2 , 5% CO_2 .

3.4 – DISPOSITIVOS E EQUIPAMENTOS

A Figura 3.1 ilustra a montagem experimental com todos os instrumentos e dispositivos, que serão descritos a seguir, utilizados para a execução deste trabalho.

3.4.1 – Câmara de Perfusão (Fabricação Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP, Figura 3.1-L): Foi construída uma câmara de perfusão (Figura 3.2) em acrílico transparente, baseada em uma câmara projetada por Gomes (1997). A câmara de perfusão (Figura 3.2-A) foi projetada de modo que a solução, após entrar na câmara (Figura 3.2-B), passe pelo cata-bolhas (Figura 3.2-C), dispositivo que evita a passagem de bolhas de ar junto com a solução. O fluxo da solução na região de trabalho (Figura 3.2D) é laminar, o que não prejudica a adesão das células à lamínula de vidro que forma o fundo da câmara, sobre a qual as células são depositadas. A solução percorre a lamínula e transborda para o degrau (Figura 3.2-E), o que evita a secagem da solução na área de trabalho caso o fluxo seja interrompido, e finalmente é sugada pela linha de vácuo ligada à saída da câmara (Figura 3.2-F).

Os eletrodos de estimulação (Figura 3.2-H) foram confeccionados em platina (diâmetro = 1mm), e fixados (Figura 3.2-I) paralelamente ao fluxo da solução nas fendas para encaixe dos eletrodos (Figura 3.2-G), nas paredes laterais internas da câmara. Isto permite uma distribuição uniforme do campo elétrico no interior da câmara de perfusão, que se aproxima à de um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes, 1997). Esta aproximação só é válida dentro de uma

região de trabalho distante dos eletrodos (2 mm), pois, devido ao fato dos eletrodos terem seção circular e serem bons condutores elétricos, o campo tende a ser maior na sua proximidade. Maior campo também é esperado a uma distância de 5 mm do degrau e da saída da solução para a lamínula (Figura 3.2-J) porque, nestes locais, a superfície da solução não é plana, o que ocasiona uma distorção do campo elétrico.

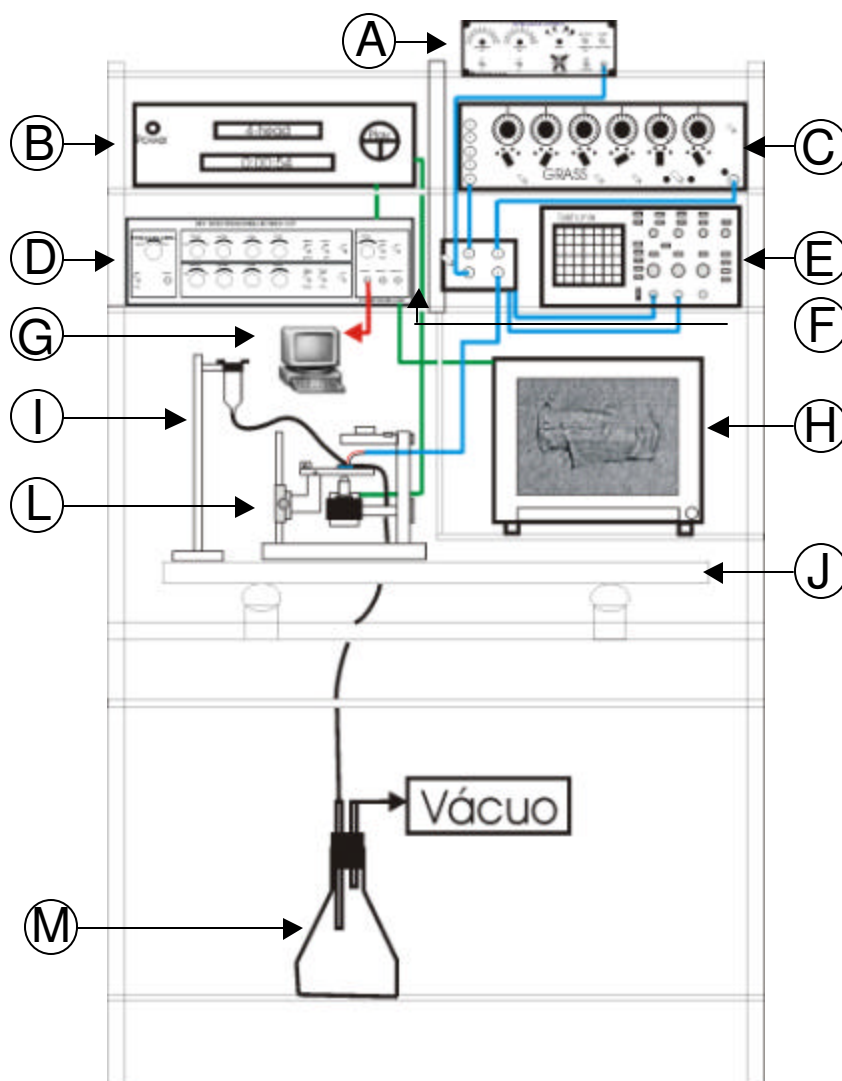


Figura 3.1: Montagem experimental: A) Estimulador elétrico de baixa potência; B) Aparelho gravador de vídeo cassete; C) Estimulador elétrico de alta potência; D) Detector de borda de sinal de vídeo; E) Osciloscópio digital; F) Comutador; G) Sistema de aquisição de dados; H) Monitor de vídeo; I) Suporte com reservatório contendo solução de Tyrode; J) Bancada anti-vibração; L) Sistema de microscopia com câmara de perfusão; M) Descarte.

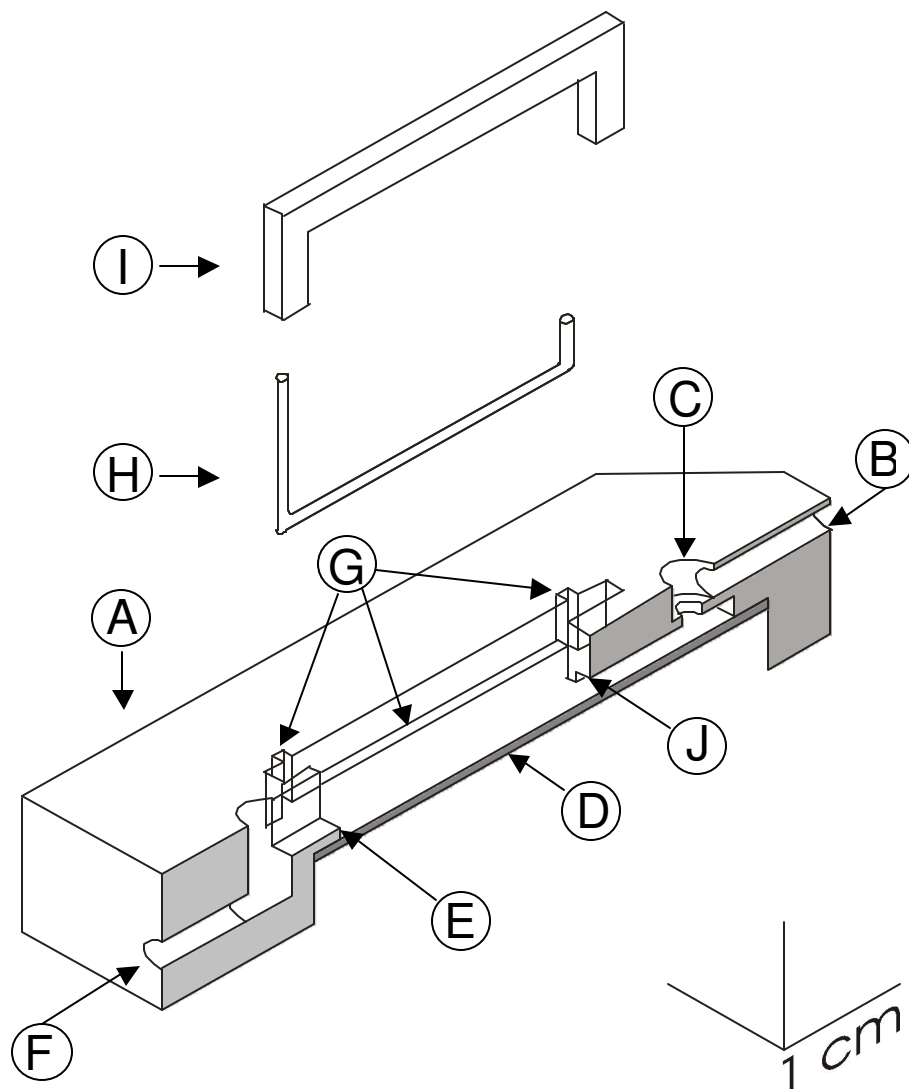


Figura 3.2: Corte longitudinal da câmara de perfusão; A) Câmara de perfusão; B) Entrada da solução; C) Cata-bolhas; D) Lâmina de vidro; E) Degrau; F) Saída para a linha de vácuo; G) Fenda para encaixe do eletrodo; H) Eletrodo de estimulação; I) Fixador do eletrodo de estimulação; J) Entrada de solução para a área de perfusão.

3.4.2 – Sistema de Microscopia (Fabricação Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP, Figura 3.1-L): A Figura 3.3 ilustra o sistema desenvolvido no presente projeto de mestrado para estudar o efeito de campos elétricos de alta intensidade sobre a atividade contrátil de miócitos cardíacos isolados.

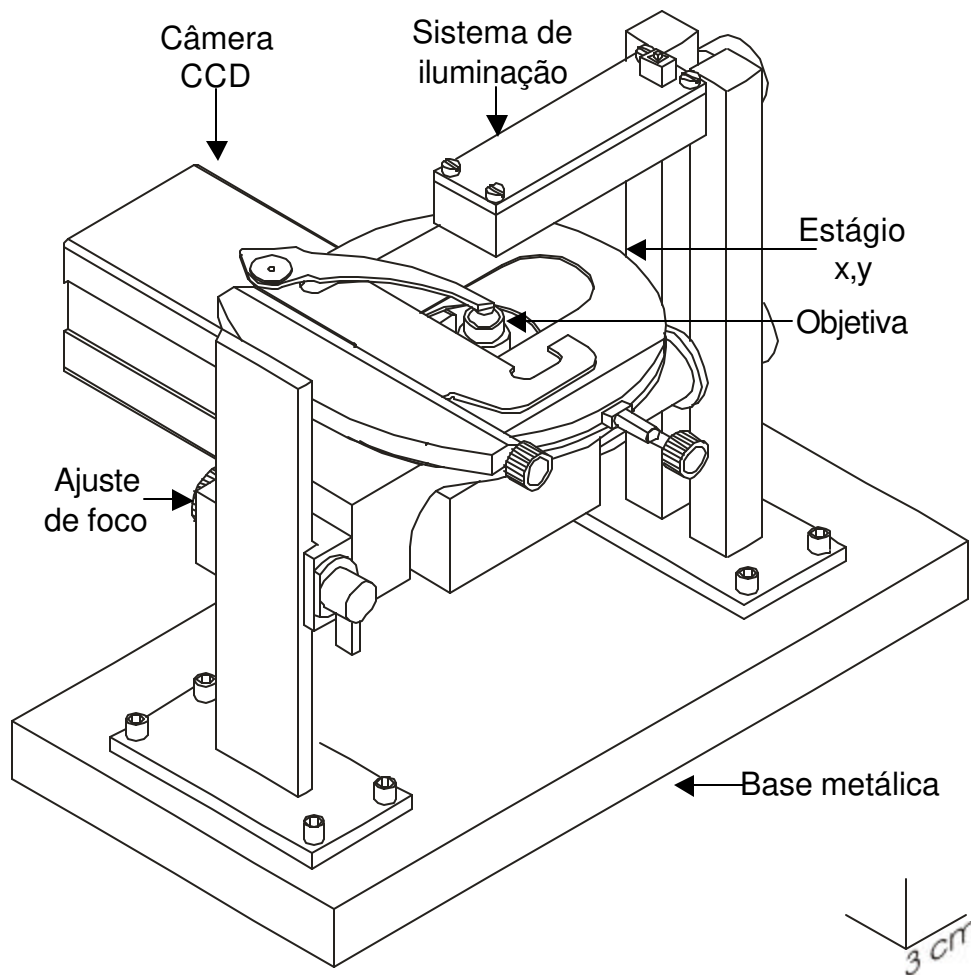


Figura 3.3: Sistema de microscopia.

Um maior detalhamento pode ser visto na Figura 3.4, que ilustra a vista explodida do sistema de microscopia. O sistema é composto de uma base metálica (31,5 x 15,5 cm, Figura 3.4-A) sobre a qual estão montados os outros componentes, permitindo uma alta estabilidade mecânica. Uma haste vertical (Figura 3.4-C) sustenta um suporte (Figura 3.4-D) para a objetiva (Plana 32 x ou 10 x, Figura 3.4-G), prisma e câmera CCD (*Charge Coupled Device*, Ikegami; ICD-31). Há ainda um sistema de iluminação (Figura 3.4-I) baseado em um LED (*light emitting diode*) vermelho de alta luminância (*Super Bright LED*, Jumbo, 5000 mcd, 1,85V, 20mA, *Archer*, N. Cat. 276 - 086), alimentado por uma bateria de 9 volts.

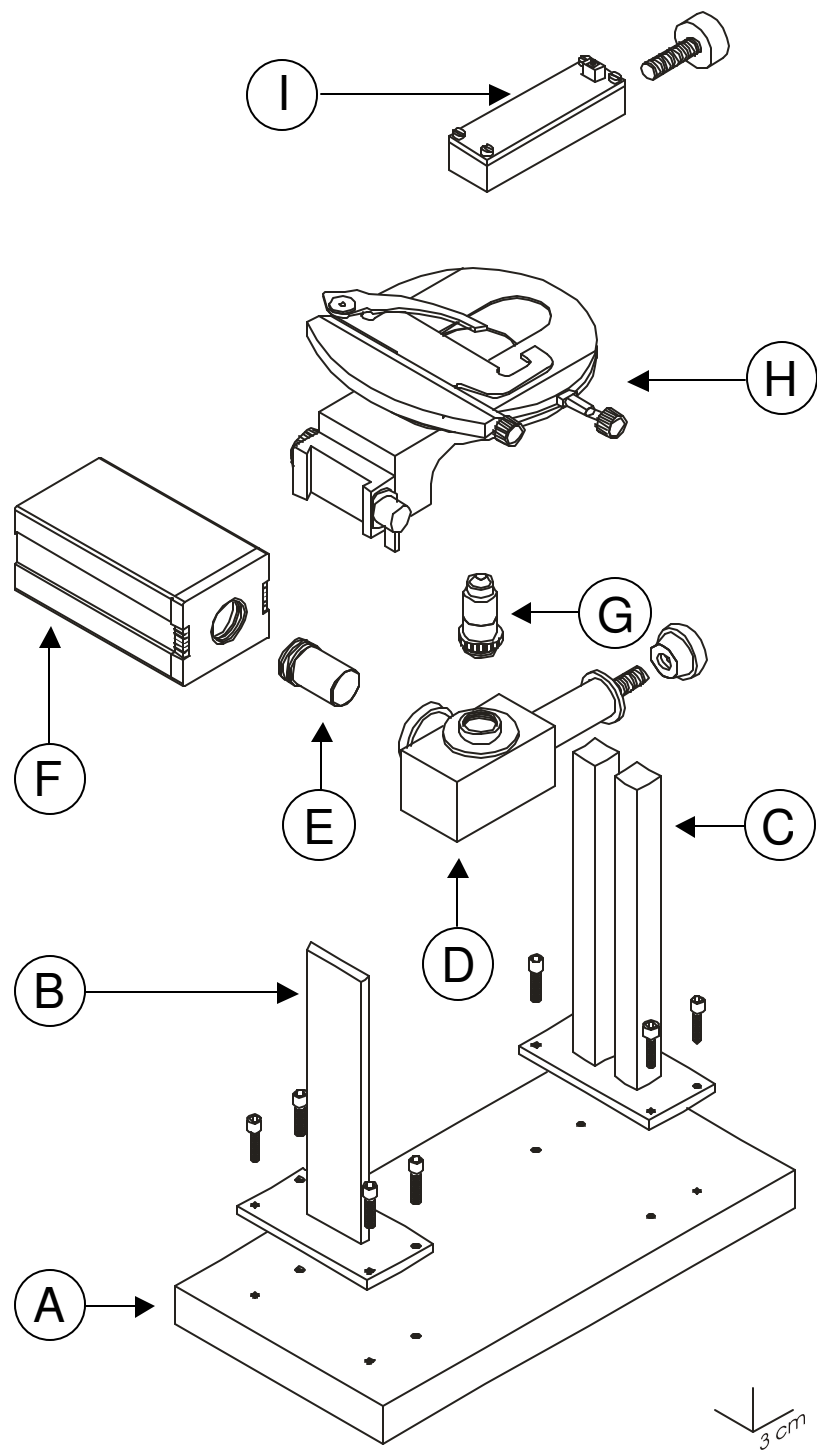


Figura 3.4: Sistema de microscopia (vista explodida). A) Base metálica; B) Haste de fixação do estágio x,y; C) Haste de sustentação do suporte da objetiva; D) Suporte da objetiva, prisma e câmera CCD; E) Adaptador da câmera; F) Câmera CCD; G) Objetiva 32x ou 10x; H) Estágio com movimento horizontal x,y e ajuste de foco; I) Sistema de iluminação (suporte + LED jumbo vermelho + bateria 9V).

Um outro pilar vertical (Figura 3.4-B) sustenta o estágio x,y (Figura 3.4-H), que apresenta um dispositivo de manipulação micrométrica e ajuste de foco.

Este sistema compacto permite a rápida visualização de células em um monitor de vídeo e possui iluminação com luz vermelha. Caso necessário, poderá ser usado em condições não compatíveis com iluminação por luz branca (e.g. uso de indicadores fluorescentes e de compostos foto-sensíveis). Como em um microscópio invertido (Figura 3.5), a fonte de luz está na parte superior (Figura 3.5-A e Figura 3.4-I). A luz vermelha atravessa a amostra (câmara com as células, Figura 3.5-B) e atinge a objetiva (Figura 3.5-E e Figura 3.4-G). No bloco onde a objetiva se encontra, a luz é refletida pelo prisma (Figura 3.5-F) para o sensor da câmera de vídeo (Figura 3.5-D), a qual está acoplada a um monitor para visualização das células.

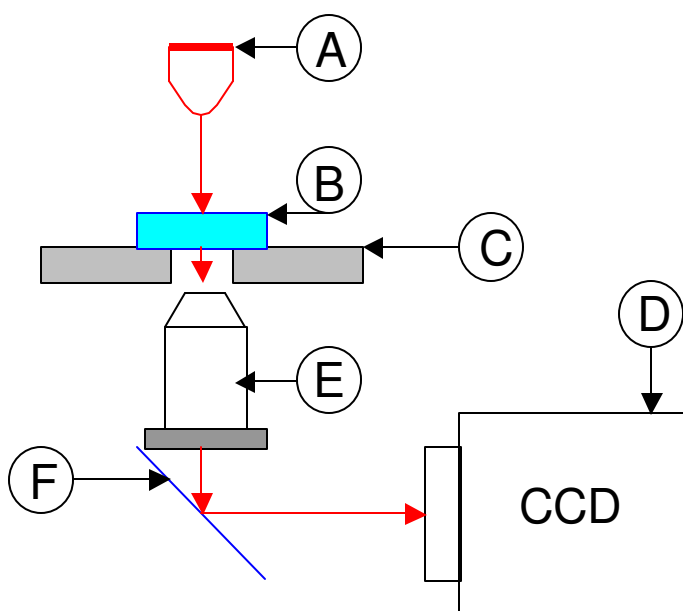


Figura 3.5: Detalhe da parte óptica do sistema de microscopia: A) LED jumbo vermelho; B) Câmara de perfusão com células; C) Estágio x,y com ajuste de foco; D) Câmara de vídeo; E) Objetiva; F) Prisma.

3.4.3 – Bancada Anti - Vibração (Fabricação Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP, Figura 3.1-J): A estabilidade mecânica é uma característica fundamental num sistema que visa coletar sinais de encurtamento celular. Assim, uma bancada anti-vibração (Figura 3.6) foi projetada, em

colaboração com outro aluno de mestrado (Rafael A. Ricardo). O projeto foi feito de modo a garantir um bom espaço de trabalho, incluindo local adequado para montagem de todos os equipamentos, e de modo que vibrações mecânicas fossem minimizadas.

A bancada é constituída de duas partes: uma armação construída com perfis metálicos e chapas de alumínio (Figura 3.6-A e B), e um sistema anti-vibratório, constituído de uma pedra de granito (Figura 3.6-C) apoiada sobre quatro bolas de tênis (Figura 3.6-A e B).

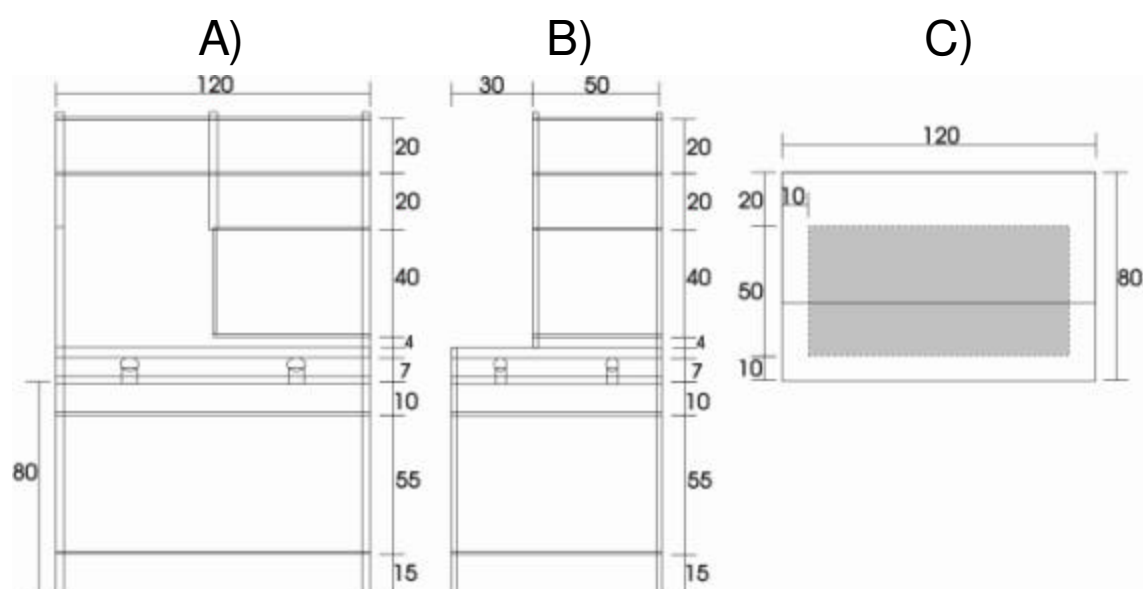


Figura 3.6: Vistas frontal (A), lateral (B) e superior (C) da bancada anti-vibração (dimensões em cm).

3.4.4 – Estimulador Elétrico de Baixa Potência (EBP, Fabricação Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP, Figura 3.1-A): Este estimulador, que foi utilizado para estimular eletricamente as células cardíacas com pulsos bipolares de baixa intensidade, possui as seguintes características:

- Pulsos retangulares de tensão elétrica (mono ou bipolares)
- Freqüência: 0,1-10 Hz
- Duração dos pulsos: 0,1- 10 ms
- Saída: 0 a 15 V

- Máxima corrente: 15 mA
- Alimentação: 110 V

3.4.5 – Estimulador Elétrico de Alta Potência (EAP, Fabricação Grass, West Warwick, RI, U.S.A. - mod. S48K, Figura 3.1-C): Este estimulador, que foi utilizado para estimular eletricamente as células cardíacas com pulsos monopolares de alta intensidade, possui as seguintes características:

- Pulsos retangulares de tensão elétrica (monopolares)
- Frequência: 0,1-100 Hz
- Duração dos pulsos: 10 μ s-10 s
- Saída: 10 mV a 150 V
- Máxima corrente: 800 mA
- Alimentação: 110 V
- Entrada para *trigger* externo

3.4.6 – Osciloscópio Digital (OSC, Fabricação Tektronix Inc., Beaverton, Oregon, U.S.A. - mod. TDS-360, Figura 3.1-E): O osciloscópio digital possui 2 canais e uma largura de banda de 60 MHz. Este instrumento foi utilizado para medir os pulsos de tensão elétrica fornecidos pelos estimuladores de baixa e alta potência.

3.4.7 – Detector de Borda de Sinal de Vídeo (DBV, Desenvolvimento e fabricação Centro de Engenharia Biomédica – Unicamp, Campinas – SP, Figura 3.1-D): O DBV é um instrumento que, basicamente, seleciona uma linha do sinal de vídeo e segue um nível de tensão elétrica correspondente à cor preta ou branca, conforme selecionado no painel. A tensão elétrica de saída fornecida é proporcional ao deslocamento de uma borda (preta ou branca), que corresponde à borda de uma célula cardíaca.

3.4.8 – Monitor de Vídeo (Fabricação Oriental, Seul, Coréia - mod. M008, Figura 3.1-H): Foi utilizado um monitor de vídeo de nove polegadas para visualização das células.

3.4.9 – Aparelho Gravador de Vídeo Cassete (VCR, Fabricação Panasonic, Manaus – AM - mod. NV-SJ405BR, Figura 3.1-B): O aparelho gravador de vídeo cassete é de fundamental importância, uma vez que permite a documentação de todo o experimento e a recuperação posterior do sinal de encurtamento celular.

3.4.10 – Comutador (Figura 3.1-F): Consiste de uma chave 2 pólos com 2 posições, que seleciona o estimulador a ser utilizado.

3.4.11 – Sistema de Aquisição de Dados (SAD, Figura 3.1-G): O SAD é constituído de uma placa de aquisição de dados de 32 canais (Cad 12/36, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP) composta de um conversor analógico digital de 12 bits com base de tempo interna de 2 MHz. A placa foi conectada a um computador (Pentium 2, 166 MHz com 32 MB de RAM) carregado com o programa AqDados para Windows (Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP). Este sistema foi utilizado para adquirir e armazenar o sinal de encurtamento celular proveniente do DBV.

3.4.12 – Reservatório da Solução de Tyrode (Figura 3.1-I): O reservatório da solução de Tyrode consiste de uma seringa de 60 ml.

3.4.13 – Descarte (Figura 3.1-M): O descarte consiste de um recipiente de vidro, conectado à linha de vácuo e à saída da câmara de perfusão.

3.5 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 – Instrumentação

3.5.1.1 – Ajuste e Calibração do Sistema de Microscopia e do DBV

Para verificar o aumento do sistema de microscopia, utilizamos uma gráticula-padrão com precisão de 10 μm (fabricação Carl Zeiss, Göttingen,

Alemanha, Figura 3.7). Posicionada sobre o estágio do sistema de microscopia, a grátícula foi centralizada no monitor de vídeo, após ajuste de foco. Uma régua foi posicionada diretamente sobre a região central da tela do monitor, e mediu-se, com cuidado para evitar erros de paralaxe, o comprimento (L , em mm) de $100\ \mu\text{m}$ da grátícula. Assim, o aumento é dado por $L/0,1$. Este procedimento foi feito para as duas objetivas (32x e 10x, Figura 3.4-G).

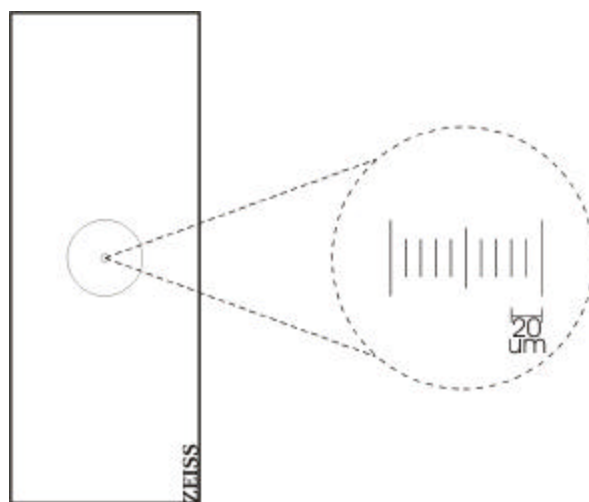
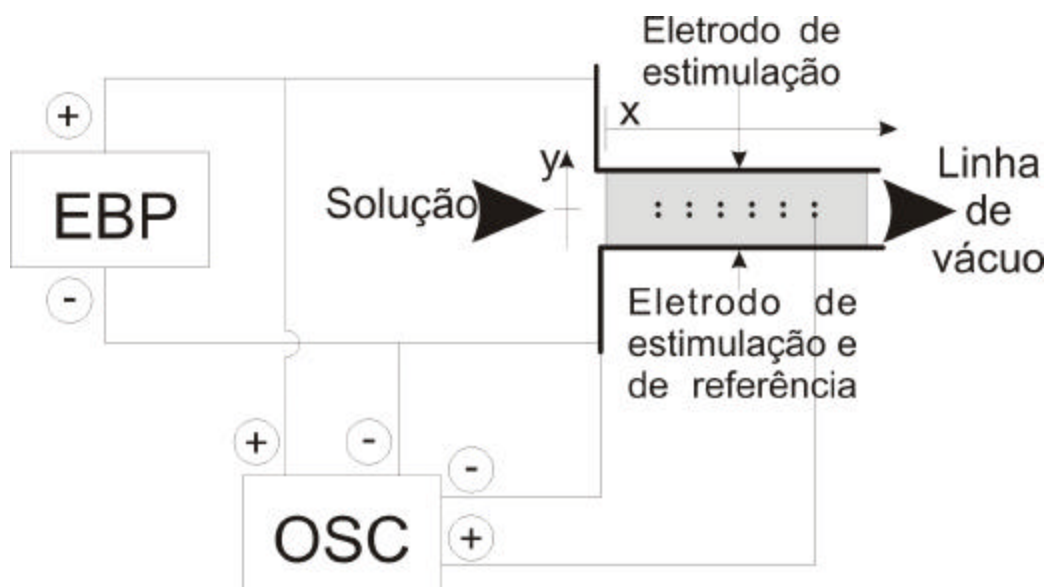


Figura 3.7: Grátícula. À direita, em destaque, a escala métrica.

Uma vez calibrado o sistema de microscopia, a grátícula foi mantida na região central do monitor. Por meio do DBV, foi selecionada uma das bordas pretas formadas pelas marcações da grátícula, e o nível de tensão elétrica correspondente à posição desta borda foi medido pelo osciloscópio. O mesmo procedimento foi repetido para uma outra borda distante $100\ \mu\text{m}$ da primeira selecionada. Deste modo, a diferença da tensão elétrica de saída do DBV nestas posições da borda foi equivalente a um deslocamento de $100\ \mu\text{m}$. Este procedimento foi realizado somente para a objetiva de 32x.

3.5.1.2 – Medição do Campo Elétrico no Interior da Câmara de Perfusão

A Figura 3.8 ilustra a montagem experimental utilizada para a execução deste procedimento.



- Posições assumidas pelo eletrodo de prova
- Área de perfusão

Figura 3.8: Montagem experimental utilizada para estimar o campo elétrico dentro da câmara de perfusão: estimulador de baixa potência (EBP); osciloscópio digital (OSC). Vide texto para detalhes.

A câmara de perfusão foi posicionada sobre o estágio x,y do sistema de microscopia, que permite movimentos com precisão de 0,1 mm em ambos os eixos. A câmara foi preenchida com solução de Tyrode. Em seguida, foram aplicados pulsos bipolares de tensão elétrica (duração de 5 ms, 0,5 Hz) aos eletrodos de estimulação, medindo-se a tensão elétrica aplicada aos eletrodos no osciloscópio. Um dos eletrodos de estimulação foi escolhido como eletrodo de referência, pois forma uma linha isopotencial ao longo da câmara, devido ao fato de ser um bom condutor. Um eletrodo de prova (agulha de aço de 0,3 mm de diâmetro) foi posicionado, por meio de um micro-manipulador, ortogonalmente em relação ao plano da lamínula, na posição $y=-1\text{mm}$ e $x=5\text{mm}$. A posição $y=0$ corresponde ao centro da câmara de perfusão e a posição $x=0$ corresponde à entrada de solução para a área de perfusão da solução para a lamínula (Figura 3.2-J). Por meio do osciloscópio, foi medido o potencial elétrico entre o eletrodo de referência e o de prova. Este procedimento foi repetido para uma nova posição do

eletrodo de prova, $y=1\text{mm}$ e $x=5\text{mm}$, de forma que o eletrodo de prova fique a distância de 2mm da posição anterior, mas na mesma posição longitudinal (x). Todo o procedimento foi repetido para mais 5 posições longitudinais (vide Figura 3.8).

O campo elétrico medido (E_{medido}) em diferentes posições ao longo do eixo longitudinal da câmara foi calculado dividindo a diferença dos potenciais obtidos entre os pontos de medição localizados na mesma posição x pela distância entre eles (2 mm). Desta maneira, o potencial de junção formado entre o eletrodo e a solução de Tyrode foi cancelado.

O campo elétrico aplicado (E) foi calculado pela aproximação do sistema a um capacitor de placas paralelas (Jones *et al.*, 1978; Gomes, 1997), segundo a expressão 3.1:

$$E = V/d \quad [3.1]$$

onde, V é a tensão elétrica (em V) aplicada aos eletrodos, e d é a distância (em cm) entre os eletrodos (no presente caso, $d=0,75\text{ cm}$).

Este procedimento foi realizado 5 vezes. Consideramos adequada a aproximação do sistema a um capacitor de placas paralelas se a média dos valores de E_{medido} , para cada posição x , apresentasse um erro menor que 2% de E .

3.5.2 – Experimentos com Células

3.5.2.1 – Procedimento Geral

Inicialmente, uma fina camada de solução de colágeno foi aplicada à lamínula no fundo da câmara de perfusão, para adesão das células. Após 20 minutos de secagem, as células foram depositadas sobre a lamínula, e um novo período de 20 minutos foi aguardado para que estas se sedimentassem e aderissem à lamínula. A preparação foi perfundida com solução de Tyrode, à taxa de 2 a 3 ml/min.

Usando a objetiva de 10x, uma célula adequada foi centralizada no monitor (Figura 3.9). A seguir, a objetiva foi trocada pela de 32x e o foco foi ajustado. As dimensões da célula, isto é, seus eixos maior (2c) e menor (2a), foram medidas diretamente sobre o monitor, para posterior cálculo das medidas reais, de acordo com o aumento do sistema de microscopia (ver Capítulo 4, item 4.1).

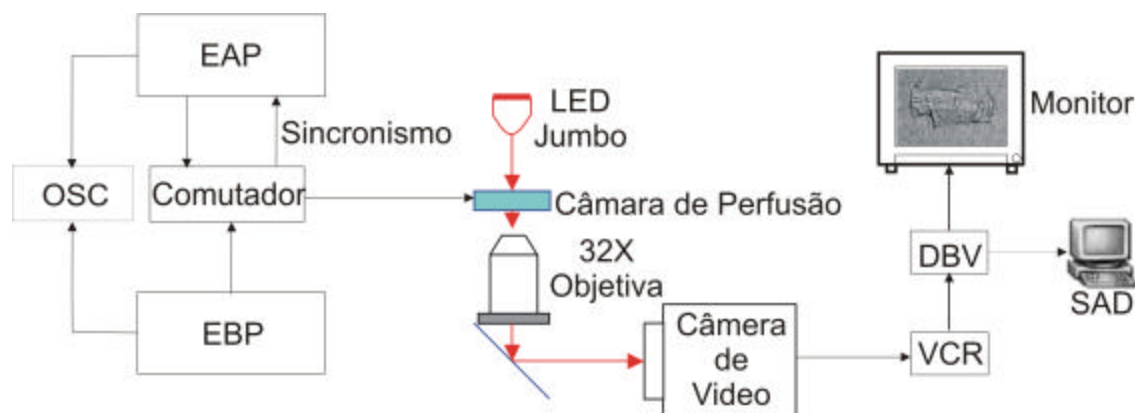


Figura 3.9: Diagrama de blocos da montagem experimental: Estimulador de Baixa Potência (EBP); Estimulador Elétrico de Alta Potência (EAP); Osciloscópio Digital (OSC); Aparelho Gravador de Vídeo Cassete (VCR); Detector de Borda de Sinal de Vídeo (DBV); Sistema de Aquisição de Dados (SAD).

Os parâmetros estimulatórios do EBP (Figura 3.9) foram ajustados para produzir pulsos bipolares de tensão elétrica (duração 10 ms no total dos dois semi-ciclos, 0,5 Hz) com amplitude inicialmente nula. A tensão elétrica de saída foi aumentada gradativamente até que o limiar excitatório fosse atingido (observado visualmente pela resposta contrátil da célula). A partir da tensão elétrica aplicada nos eletrodos da câmara de perfusão, medida no osciloscópio (Figura 3.9), E pôde ser calculado por meio da expressão 3.1. Em seguida, a tensão elétrica foi aumentada em 20%, mantendo-se a estimulação.

3.5.2.2 - Campo elétrico letal em miócitos cardíacos isolados

Neste procedimento, foram selecionadas células cujo eixo maior se orientava na direção longitudinal (grupo Long, $n=13$) ou na direção transversal (grupo Transv, $n=17$), com relação à direção do E aplicado (Figura 3.10), com um desvio máximo de 5° .

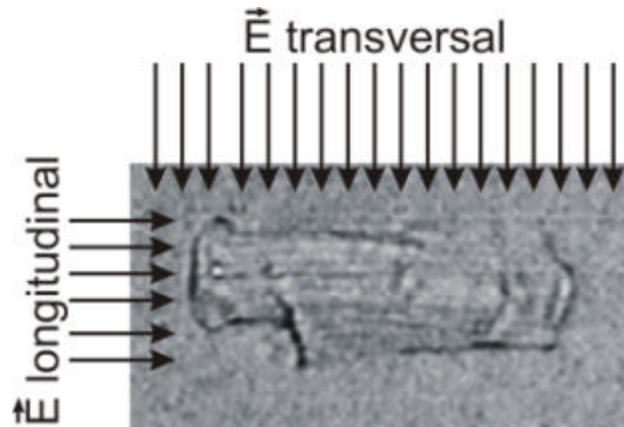


Figura 3.10: Foto de um miócito ventricular de rato. As direções de aplicação do campo elétrico estão indicadas.

A Figura 3.11 descreve o protocolo de aplicação de pulsos elétricos à câmara de estimulação.

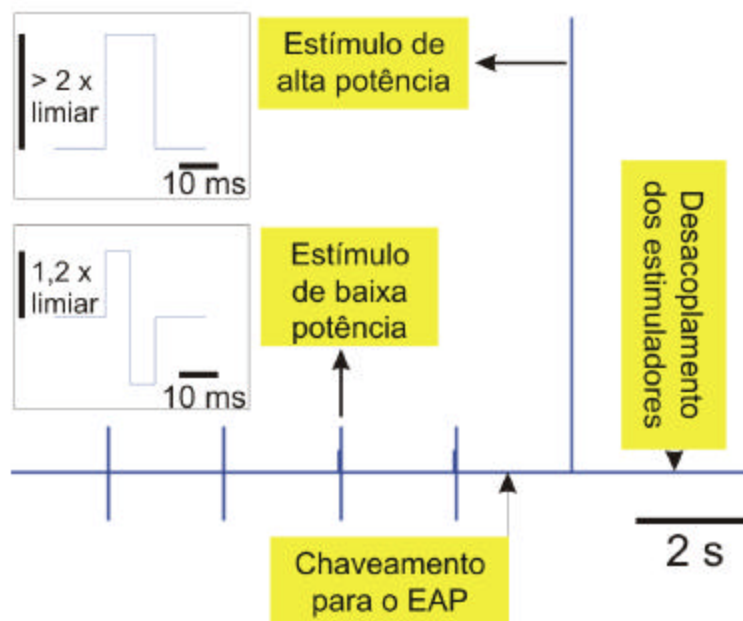


Figura 3.11: Protocolo de aplicação de pulsos elétricos à câmara de estimulação.

As células foram estimuladas pelo EBP com estímulos de baixa potência (1,2 vezes o limiar) durante um certo tempo, acima do tempo mínimo para que as contrações entrassem em regime permanente. O EAP (Figura 3.9), sincronizado com o EBP, foi ajustado para produzir pulsos de alta intensidade com duração de

10 ms, inicialmente de 2 vezes o valor do limiar excitatório. No intervalo entre 2 pulsos, a estimulação era "chaveada" do EBP para o EAP por meio do comutador (Figura 3.9). Após aplicação de um único pulso de alta intensidade (Figura 3.11), o EAP era desacoplado por meio de outra micro-chave localizada em seu painel (Figura 3.11).

Aguardou-se, em geral, de um 1,5 a 5 minutos, dependendo da reação da célula, para reinício da estimulação com o EBP. Da mesma forma que anteriormente, o EAP foi ajustado para uma amplitude de 4 vezes o limiar, o pulso de alta intensidade foi aplicado à preparação, e um novo período de estabilização foi observado. Este procedimento foi repetido para estímulos de alta intensidade com amplitudes entre 8 e 30 vezes o limiar estimulatório. Se a célula não resistisse (desenvolvimento de contração irreversível), o experimento era finalizado. Para trabalhar com nova célula, a câmara era limpa com água deionizada e todo o procedimento era executado novamente.

Adotamos o modelo do esferóide prolato (Figura 3.12), proposto por Klee e Plonsey (1976), para o cálculo da ΔV_m a partir das dimensões celulares ($2a$ e $2c$) e dos valores de E aplicados. Assim, cada célula foi aproximada por um esferóide descrito pela equação 3.2:

$$x^2/a^2 + y^2/a^2 + z^2/c^2 = 1 \quad [3.2]$$

onde c e a são os semi-eixos maior e menor do esferóide, respectivamente.

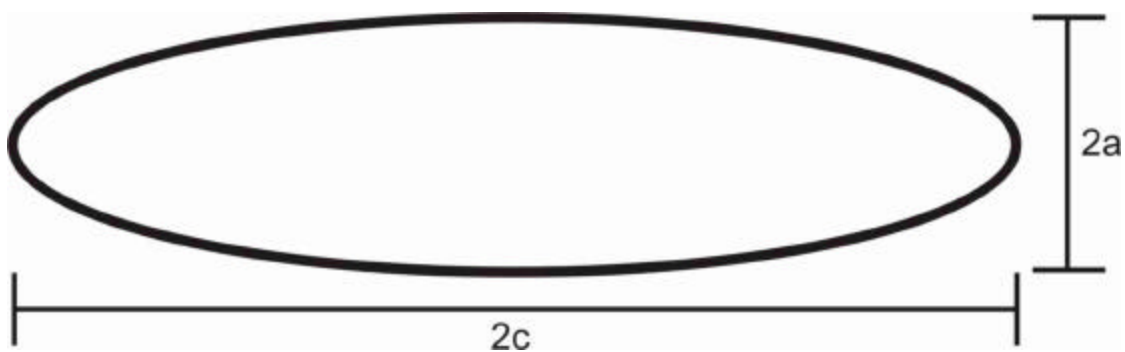


Figura 3.12: Esferóide prolato, onde $2a$ e $2c$ são os comprimentos dos eixos menor e maior, respectivamente.

Um campo $\mathbf{E} = E_{0x} \mathbf{x} + E_{0y} \mathbf{y} + E_{0z} \mathbf{z}$ produz uma ΔV_m dada por (Klee & Plonsey, 1976):

$$\Delta V_m(x, y, z) = (E_{0x} x + E_{0y} y)A + (E_{0z} z)C \quad [3.3]$$

onde,

$$A = \{1 - 0,5 \epsilon^{-2} - [0,25(1 - \epsilon^2) \ln[(1 - \epsilon)/(1 + \epsilon)]] \epsilon^{-3}\}^{-1} \quad [3.4]$$

$$C = \{\epsilon^{-2} - [0,5(1 - \epsilon^2) \ln[(1 - \epsilon)/(1 + \epsilon)]] \epsilon^{-3}\}^{-1} \quad [3.5]$$

$$\epsilon = (1 - a^2/c^2)^{1/2} \quad [3.6]$$

Restringindo $\mathbf{E}$ ao plano $\mathbf{x}, \mathbf{z}$ temos:

$$\Delta V_m(x, z) = (E_{0x} x)A + (E_{0z} z)C \quad [3.7]$$

Portanto, em células do grupo Transv, ΔV_m e ΔV_m máxima ($\Delta V_{\max}$) são dadas pelas equações 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$\Delta V_m(x, z) = E A x \quad [3.8]$$

$$\Delta V_{\max} = E A a \quad [3.9]$$

Já em células do grupo Long, ΔV_m e $\Delta V_{\max}$ são dadas pelas equações 3.10 e 3.11, respectivamente.

$$\Delta V_m(x, z) = E C z \quad [3.10]$$

$$\Delta V_{\max} = E C c \quad [3.11]$$

3.5.2.2 – Influência da concentração externa de cálcio ($[Ca^{2+}]_o$)

Para verificar a possibilidade de que a entrada de Ca^{2+} na célula a partir do meio externo seja a principal causadora da morte celular após a aplicação do pulso de alta intensidade (Tung *et al*, 1994; Krauthamer & Jones, 1998), removeu-se, em alguns experimentos, o Ca^{2+} do meio extracelular. As células foram

estimuladas com estímulos de baixa potência (1,2 vezes o limiar) até a estabilização das contrações. A solução de perfusão foi então trocada por uma solução de Tyrode sem Ca^{2+} . Nesta condição, a atividade contrátil não é ativada, uma vez que o Ca^{2+} externo é necessário para disparar o processo de AEC. A perda de resposta à estimulação elétrica indicava que a solução de perfusão tinha sido trocada por completo. A seguir, um único pulso de 20 vezes o limiar estimulatório (previamente ajustado no EAP), conhecidamente letal, foi aplicado. Após 30-40 s, o perfusato foi novamente trocado pelo anterior (solução de Tyrode contendo 1mM de Ca^{2+}). Durante todo o experimento, procedeu-se ao registro contínuo do comprimento celular. Este procedimento foi repetido para 4 células.

3.6 – PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

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

Os dados dos experimentos com campos de alta intensidade foram analisados pelo programa *Prism* 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), com a ferramenta de cálculo *survival test*. O programa gera tabelas de probabilidade de letalidade em função da intensidade do campo estimulatório a partir dos dados primários, que foram apresentados da seguinte forma:

<Campo elétrico sub-letal máximo>	0
<Campo elétrico letal>	1

Uma tabela com todos os dados (um par, como acima, para cada célula) foi alimentada como entrada para o programa. A saída foi uma tabela com as probabilidades de letalidade em função de **E** (ou ΔV_{max}), à qual efetuamos um ajuste não-linear por uma função sigmóide:

$$f(x)=1/(1+10^{((k1-x)*k2)})$$

onde, k_1 equivale ao valor de E ou $\Delta V_{\max}$ correspondente a 50% de letalidade média (EL50 ou ΔV_{m50} , respectivamente), e k_2 equivale ao “coeficiente de Hill” (HS), ou seja, descreve a inclinação da parte linear da curva. Os limites do intervalo de confiança para 95% (IC95%) para EL50, ΔV_{m50} e HS também foram determinados.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado indicativo de significância estatística. Os valores de E_{medido} ao longo do eixo x da câmara de perfusão foram comparados por análise de variância monofatorial, seguida do teste de Dunnet, para comparação com E . Os valores de E e $\Delta V_{\max}$ no limiar de estimulação para células orientadas nas direções transversal e longitudinal ao campo elétrico foram comparados pelo teste *t de Student* para amostras não pareadas. A não sobreposição dos IC95% de EL50 e ΔV_{m50} nos grupos Transv e Long foi considerada como indicativa de diferença estatisticamente significativa.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 – SISTEMA DE MICROSCOPIA

O sistema de microscopia mostrou-se compacto (Figura 4.1) e de fácil manejo. A amplificação obtida foi de 910 vezes quando utilizada a objetiva de 32x, e de 260 vezes, quando utilizada a objetiva de 10x. A relação entre tensão elétrica de saída do DBV e o deslocamento da borda foi de 15,2 mV por μm .

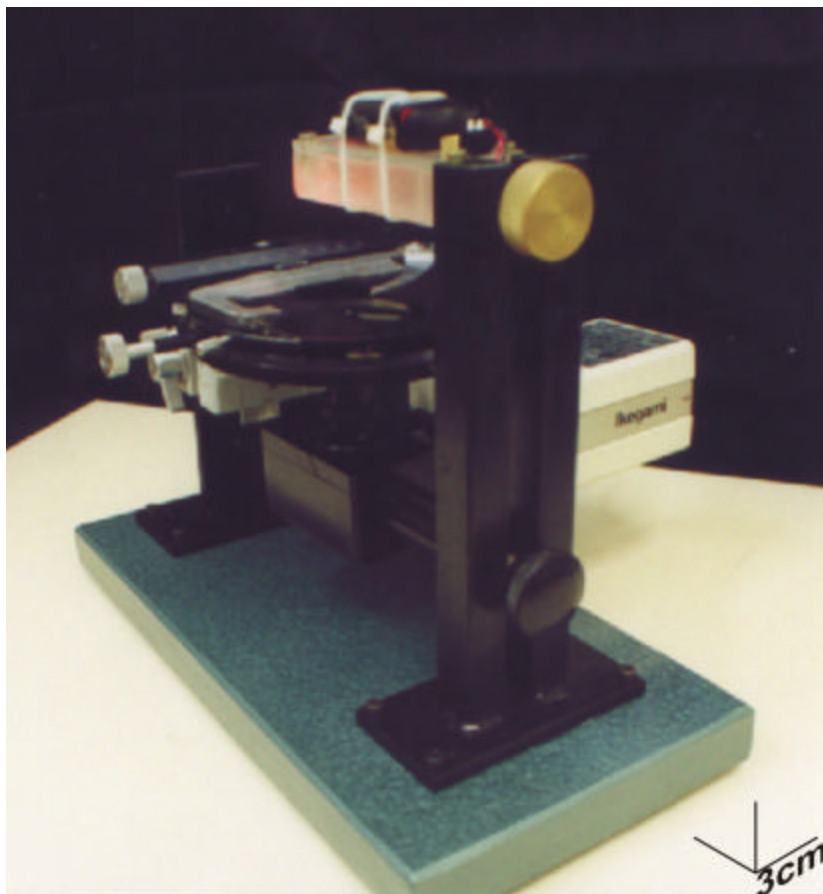


Figura 4.1: Sistema de microscopia.

4.2 – MEDIÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE PERFUSÃO

A Tabela 4.1 e a Figura 4.2 relacionam **E** e as médias dos valores de E_{medido} para cada posição x .

Tabela 4.1: Médias $\pm$ erros-padrões da média do campo elétrico medido (E_{medido} , $n = 5$) e do campo elétrico aplicado calculado (**E**) para cada posição (x) do eixo longitudinal central da câmara de perfusão.

x (mm)	E (V/cm)	E_{medido} (V/cm)
5,0	15,0	$14,9 \pm 0,3$
8,0	15,0	$15,0 \pm 0,2$
11,0	15,0	$14,7 \pm 0,2$
14,0	15,0	$14,9 \pm 0,2$
17,0	15,0	$15,0 \pm 0,2$
20,0	15,0	$14,7 \pm 0,2$

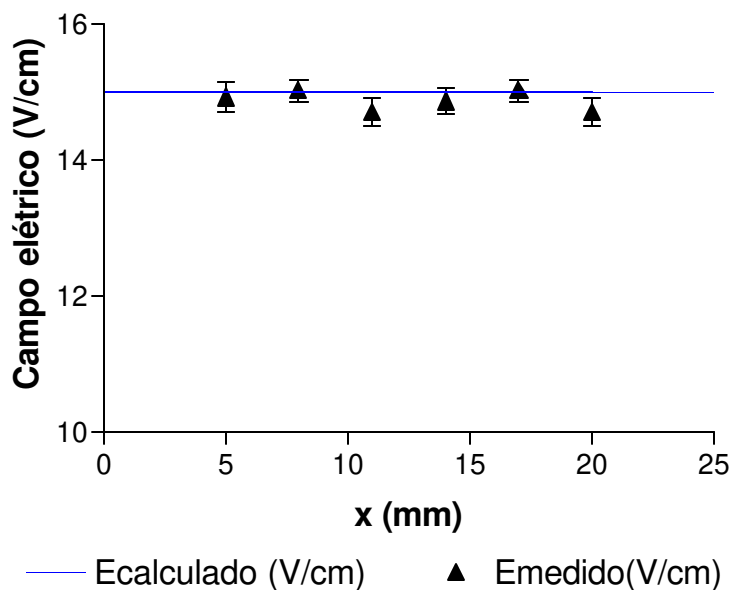


Figura 4.2: Campo elétrico ao longo do eixo longitudinal da câmara de perfusão. As linhas verticais indicam o erro-padrão da média.

Os dados da Tabela 4.1 mostram que o E_{medido} não varia mais que 2% do E ao longo de x . A análise de variância e o teste de Dunnet indicaram que E_{medido} não dependeu de x e não diferiu estatisticamente de E .

4.3 – CAMPO ELÉTRICO LETAL EM MIÓCITOS CARDÍACOS ISOLADOS

Foram analisadas 17 e 13 células nos grupos Transv e Long, respectivamente. Todas as análises a seguir (i.e., estimativa da amplitude de campos limiar e letal, e respectivos valores de ΔV_{max}) foram realizadas com dados extraídos destas populações de células.

A estimulação por campo elétrico inicia o AEC pelo desencadeamento de um PA. Etapas da contração celular podem ser vistas na Figura 4.3: inicialmente a célula está em repouso (Figura 4.3-A); após ser estimulada com um pulso bipolar (20% acima do limiar de estimulação), ela se contrai (Figura 4.3-B); a seguir, ela se relaxa, voltando ao comprimento de repouso (Figura 4.3-C). A forma de onda de encurtamento do miócito durante esta mesma contração, expressa como porcentagem do comprimento de repouso da célula, pode ser observada na Figura 4.3-D.

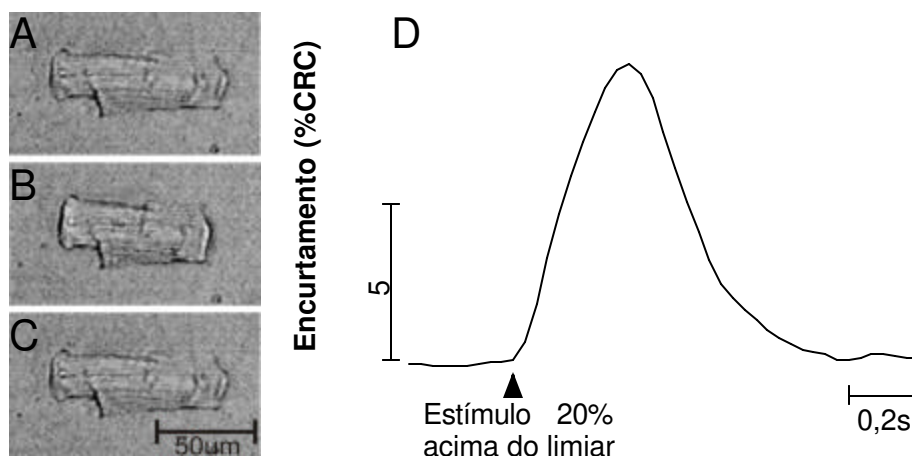


Figura 4.3: Contração celular em resposta a um estímulo elétrico 1,2x o limiar de estimulação: A) Célula em repouso; B) Célula logo após o estímulo, no pico do encurtamento; C) Célula em repouso, após o relaxamento; D) Registro do encurtamento celular, expresso como porcentagem do comprimento de repouso da célula (CRC).

A estimulação (monopolar) por campos elétricos de alta intensidade (20 vezes o limiar de estimulação), por outro lado, pode causar contração irreversível da célula, como mostrado na Figura 4.4.

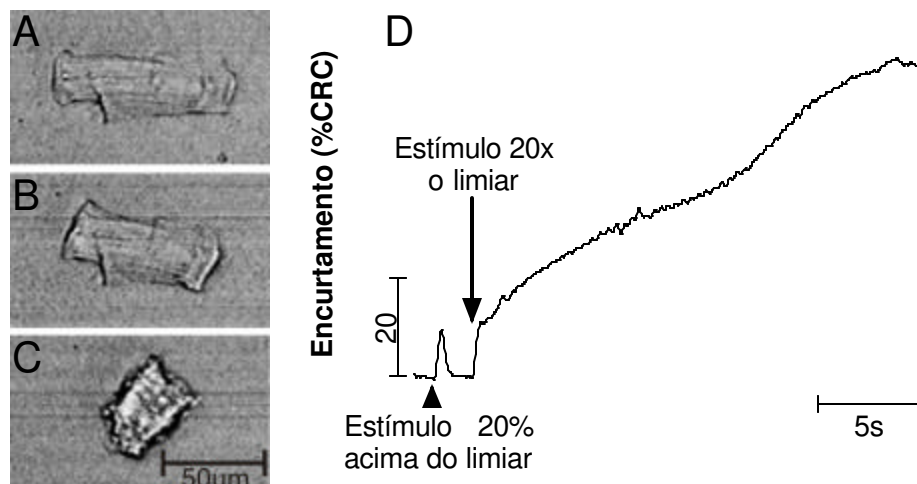


Figura 4.4: Registro da geração de contratura irreversível, seguida de morte celular, causada pela aplicação de um estímulo monopolar de alta intensidade (20x o limiar de estimulação): A) Célula em repouso; B) Célula logo após aplicação do estímulo de alta intensidade; C) Célula 3 minutos após a aplicação do estímulo de alta intensidade (hipercontratura); D) Registro do encurtamento celular, expresso como porcentagem do comprimento de repouso da célula (CRC).

A Figura 4.5 ilustra o efeito sobre o comprimento celular do campo elétrico aplicado a uma célula do grupo Transv, durante o procedimento experimental descrito no Capítulo 3, item 3.5.2 (Campo elétrico letal em miócitos cardíacos isolados). Observou-se a ocorrência de algumas contrações espontâneas (*) durante a pausa estimulatória após os pulsos-testes. Estas contrações não representam efeitos deletérios da estimulação, pois são comuns em miócitos ventriculares de rato durante o repouso (Capogrossi *et al.*, 1986). Pode-se ver também que estímulos de amplitude 4x e 8x o limiar não foram letais, e não prejudicaram a resposta da célula à estimulação subsequente com campo de baixa intensidade. No entanto, o estímulo de 20x o limiar produziu um campo letal, levando a uma contratura irreversível e morte celular.

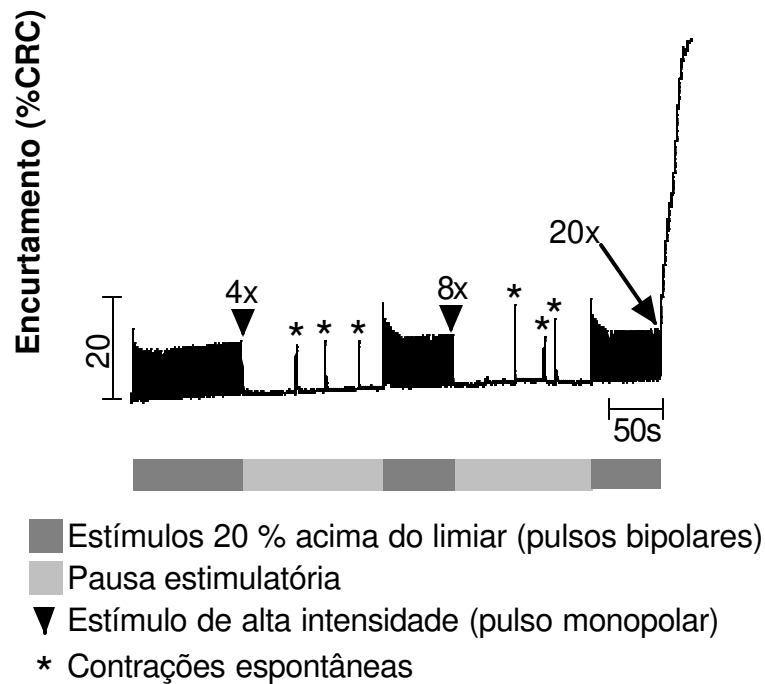


Figura 4.5: Registro do encurtamento celular, expresso como % do comprimento de repouso da célula (CRC), durante a aplicação do procedimento experimental para determinação do campo estimulatório letal. Observe que após a contratura evocada pelo estímulo de 20x o limiar de estimulação, o comprimento celular não retorna ao nível de repouso.

A Figura 4.6 ilustra os valores de campo limiar de estimulação (E_T), de acordo com a orientação de aplicação do campo (vide Apêndice A). Em células do grupo Transv, o campo limiar foi de $7,24 \pm 0,27$ V/cm, cerca de 2 vezes maior do que em células do grupo Long ($3,25 \pm 0,26$ V/cm, $p < 0,001$), como já observado anteriormente no nosso laboratório (Lima, 1999).

Os valores de $\Delta V_{\max}$ calculados no limiar de estimulação (ΔV_T , Klee & Plonsey, 1976) estão apresentados na Figura 4.7. Em células Transv, ΔV_T foi de $18,98 \pm 0,78$ mV, e em células Long estimou-se ΔV_T em $20,35 \pm 1,51$ mV. Portanto, apesar da diferença no campo limiar, ΔV_T foi comparável em ambos os grupos ($p > 0,05$), como já demonstrado anteriormente em nosso laboratório (Lima, 1999).

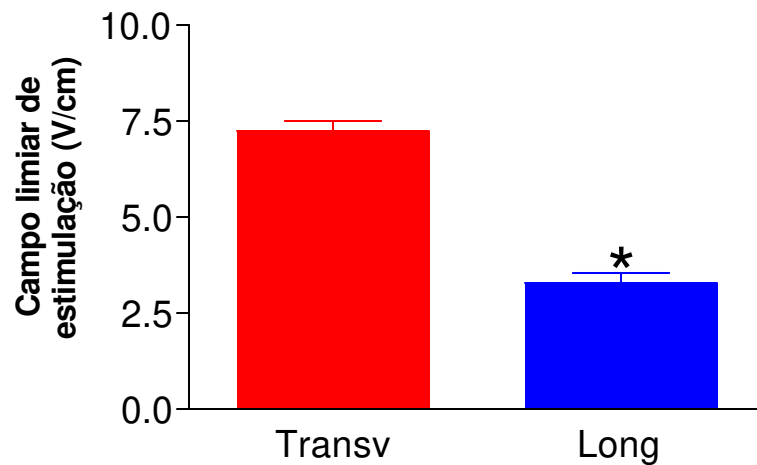


Figura 4.6: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) do campo limiar de estimulação (V/cm) em células orientadas nas direções transversal (Transv, n= 17) e longitudinal (Long, n= 13), com relação à direção de aplicação do campo elétrico. O asterisco indica $p < 0,05$.

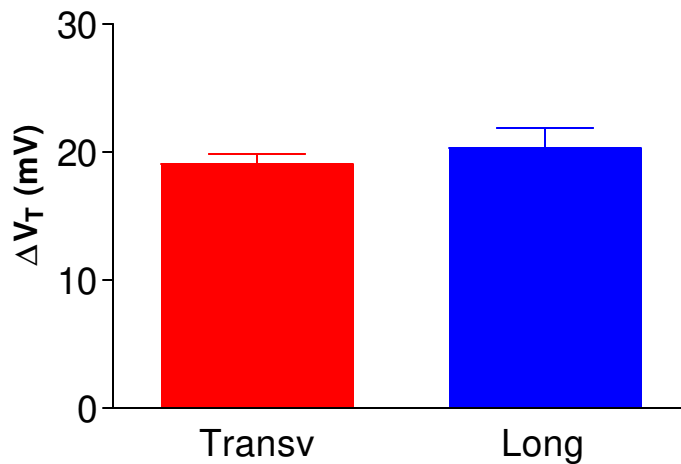


Figura 4.7: Média (barras) e erro-padrão da média (linhas verticais) da máxima variação do potencial transmembrana calculado (ΔV_T) em resposta à aplicação do campo limiar em células orientadas nas direções transversal (Transv, n= 17) e longitudinal (Long, n= 13) com relação à direção de aplicação do campo elétrico.

Os valores individuais dos campos elétricos sub-letais máximos (0) e letais (1) para células Transv e Long estão apresentados na Tabela 4.2 e na Figura 4.8.

Tabela 4.2: Campos elétricos sub-letais máximos (0) e letais (1) de células orientadas nas direções transversal (n = 17) e longitudinal (n = 13), com relação à direção de aplicação do campo elétrico.

Células na direção transversal			Células na direção longitudinal		
Células	E(V/cm)	Resultados	Células	E(V/cm)	Resultados
T1	142,93	0	L1	44,80	0
	160,80	1		59,73	1
T2	59,73	0	L2	42,24	0
	119,47	1		56,32	1
T3	117,33	0	L3	64,00	0
	146,67	1		85,33	1
T4	144,00	0	L4	59,73	0
	160,00	1		74,67	1
T5	65,07	0	L5	42,67	0
	162,67	1		53,33	1
T6	43,73	0	L6	43,73	0
	109,33	1		54,67	1
T7	43,73	0	L7	44,16	0
	109,33	1		73,60	1
T8	55,47	0	L8	49,49	0
	138,67	1		61,87	1
T9	62,93	0	L9	74,67	0
	157,33	1		93,33	1
T10	106,00	0	L10	46,93	0
	113,07	1		58,67	1
T11	114,00	0	L11	46,67	0
	121,60	1		56,00	1
T12	102,40	0	L12	50,13	0
	136,53	1		62,67	1
T13	45,87	0	L13	75,73	0
	91,73	1		94,67	1
T14	100,80	0			
	134,40	1			
T15	113,07	0			
	141,33	1			
T16	65,60	0			
	87,47	1			
T17	114,00	0			
	152,00	1			

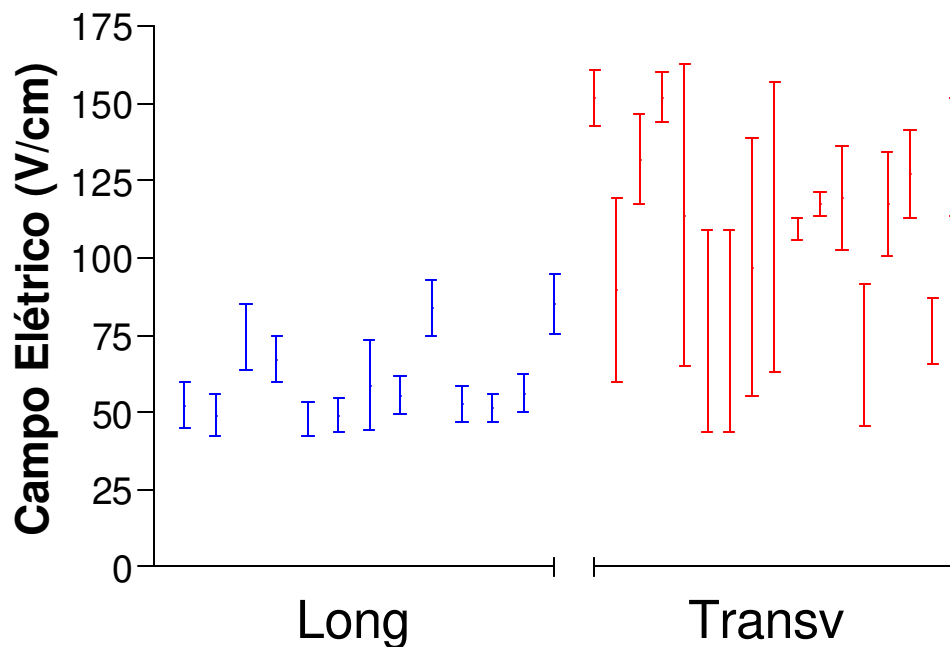


Figura 4.8: Intervalos entre os campos elétricos sub-letal máximo (limite inferior da linha vertical) e letal (limite superior da linha vertical) em células orientadas nas direções transversal (Transv) e longitudinal (Long) com relação à direção de aplicação do campo elétrico. Os intervalos correspondem aos dados de cada célula.

Na Figura 4.9, estão apresentadas as curvas de letalidade celular, em função da intensidade do campo elétrico estimulatório aplicado às células dos grupos Long e Transv. Os pontos referem-se aos valores médios da tabela de probabilidade de letalidade, gerada pela aplicação da ferramenta *survival test* aos dados da Tabela 4.2 (vide Apêndice A). A curva é o resultado do ajuste de uma função sigmóide aos pontos. Os valores de EL50 (i.e., a intensidade de campo associada com letalidade em 50% das células) estimados deste ajuste estão na Tabela 4.3. Do mesmo modo que observado para o campo limiar, as células Long foram mais sensíveis ao campo elétrico, pois EL50 neste grupo foi de cerca da metade daquele no grupo Long. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4.3: Valores médios do campo elétrico associado com 50% de letalidade (EL50) e a inclinação da curva (HS), com respectivos intervalos de confiança para 95% (IC95%), determinados em células orientadas nas direções transversal e longitudinal à direção de aplicação do campo elétrico.

	Direção	média	IC95%
EL50 (V/cm)	Transversal	137,50	135,80 a 139,20
	Longitudinal	67,60	66,30 a 68,90
HS (cm/V)	Transversal	0,029	0,026 a 0,032
	Longitudinal	0,049	0,039 a 0,059

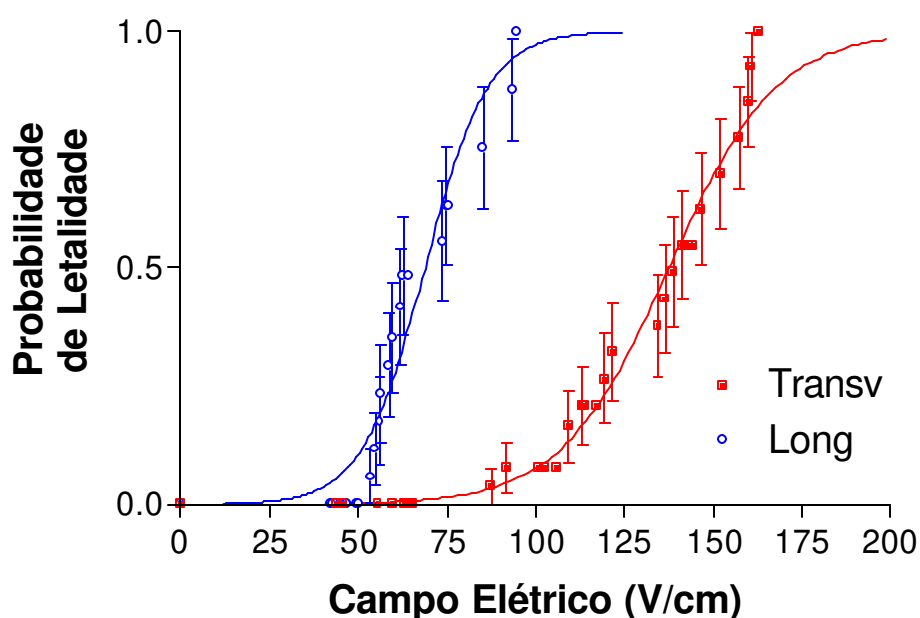


Figura 4.9: Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico, obtidas em miócitos ventriculares de rato orientados nas direções transversal (Transv, $n = 17$) e longitudinal (Long, $n = 13$) com relação à direção de aplicação do campo elétrico. As linhas verticais indicam o erro-padrão da média.

Quando os valores de campo foram convertidos a múltiplos do campo limiar obtido na mesma célula, observou-se que o EL50 em células Long se aproximou daquele estimado em células Transv (Figura 4.10), embora ainda tenha sido detectada diferença significativa entre os grupos de células (IC95% não se sobrepõem, Tabela 4.4). Os pontos médios das curvas encontram-se no Apêndice A.

Tabela 4.4: Valores médios do campo elétrico associado com 50% de letalidade (EL50) e a inclinação da curva (HS), com respectivos intervalos de confiança para 95% (IC95%), determinados em células orientadas nas direções transversal e longitudinal à direção de aplicação do campo elétrico. O campo elétrico foi expresso como um múltiplo do campo limiar (x_{Limiar}).

	Direção	média	IC95%
EL50 (x_{Limiar})	Transversal	17,87	16,76 a 18,98
	Longitudinal	20,31	19,83 a 20,79
HS(x_{Limiar}^{-1})	Transversal	0,38	0,05 a 0,71
	Longitudinal	0,18	0,14 a 0,21

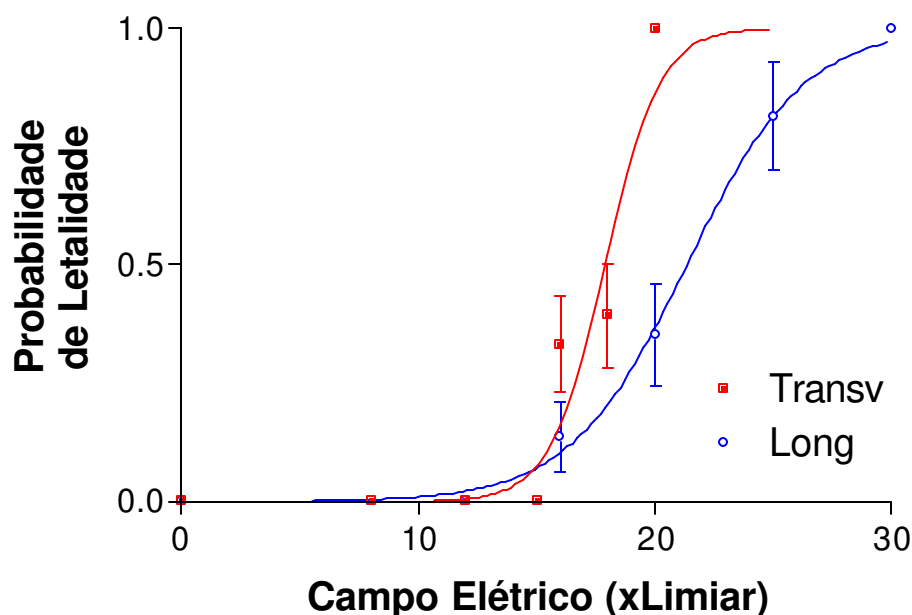


Figura 4.10: Curvas de letalidade em função da intensidade do campo elétrico obtidas em miócitos ventriculares de rato orientadas nas direções transversal (Transv) e longitudinal (Long) com relação à direção de aplicação do campo elétrico. Nestas curvas, o campo elétrico foi expresso como um múltiplo do campo limiar (x_{Limiar}) em cada célula. As linhas verticais indicam o erro-padrão da média.

Quando as curvas de letalidade foram determinadas em função de ΔV_{max} nas mesmas populações de células (os valores de ΔV_{max} estão apresentados no Apêndice A), observou-se uma inversão das curvas nos grupos Transv e Long (Figura 4.11), em comparação as curvas de letalidade em função da intensidade

absoluta do campo elétrico (Figura 4.9). Ou seja, para uma dada probabilidade de letalidade, a aplicação de campos relativamente maiores estava associada a menor variação máxima de V_m em células do grupo Transv, comparadas às do grupo Long. Como mostra a Tabela 4.5, a $\Delta V_{\max}$ associada com 50% de letalidade ($\Delta V_{\max 50}$) foi significativamente menor ($p < 0,05$) em células Transv.

Tabela 4.5: Valores médios da variação máxima de V_m ($\Delta V_{\max}$) associada com 50% de letalidade ($\Delta V_{\max 50}$) e a inclinação da curva (HS), com respectivos intervalos de confiança para 95% (IC95%), determinados em células orientadas nas direções transversal e longitudinal à direção de aplicação do campo elétrico.

	Direção	média	IC95%
ΔV_{m50} (mV)	Transversal	355,20	350,00 a 360,40
	Longitudinal	413,50	407,80 a 419,20
HS(mV ⁻¹)	Transversal	0,010	0,009 a 0,012
	Longitudinal	0,008	0,007 a 0,009

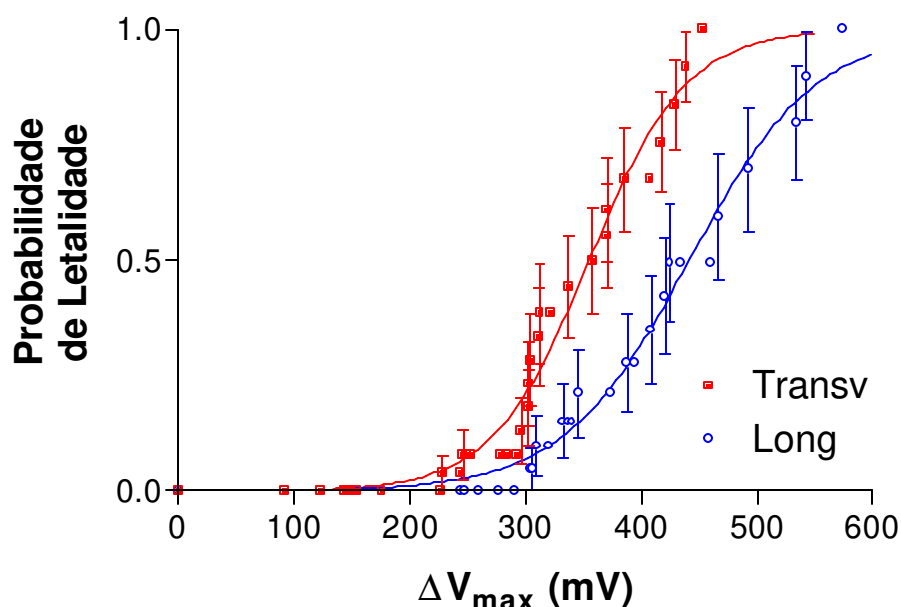


Figura 4.11: Curvas de letalidade em função da variação máxima do potencial transmembrana ($\Delta V_{\max}$) obtidas em miócitos ventriculares de rato, orientados nas direções transversal (Transv) e longitudinal (Long) com relação à direção de aplicação do campo elétrico. As linhas verticais indicam o o erro-padrão da média.

4.4 – INFLUÊNCIA DA $[Ca^{2+}]_o$

A Figura 4.12 ilustra o efeito do campo elétrico aplicado sobre o encurtamento celular durante perfusão com solução sem Ca^{2+} . Pode-se observar que a célula, embora se contraindo em resposta à estimulação em solução contendo 1 mM Ca^{2+} , cessou sua atividade contrátil quando a solução de perfusão foi trocada pela solução de Tyrode com $[Ca^{2+}]_o \sim 0$ mM, mesmo sob estimulação elétrica. A aplicação de um estímulo monopolar de alta intensidade (20x o limiar), conhecidamente letal, não afetou o comprimento da célula. Porém, quando se retornou à perfusão com a solução Tyrode com $[Ca]_o = 1$ mM, ocorreu contratura irreversível e morte celular.

Todas as quatro células estudadas com este protocolo apresentaram o mesmo comportamento descrito acima, indicando que a hipercontratura e subsequente morte celular dependem da presença do Ca^{2+} extracelular.

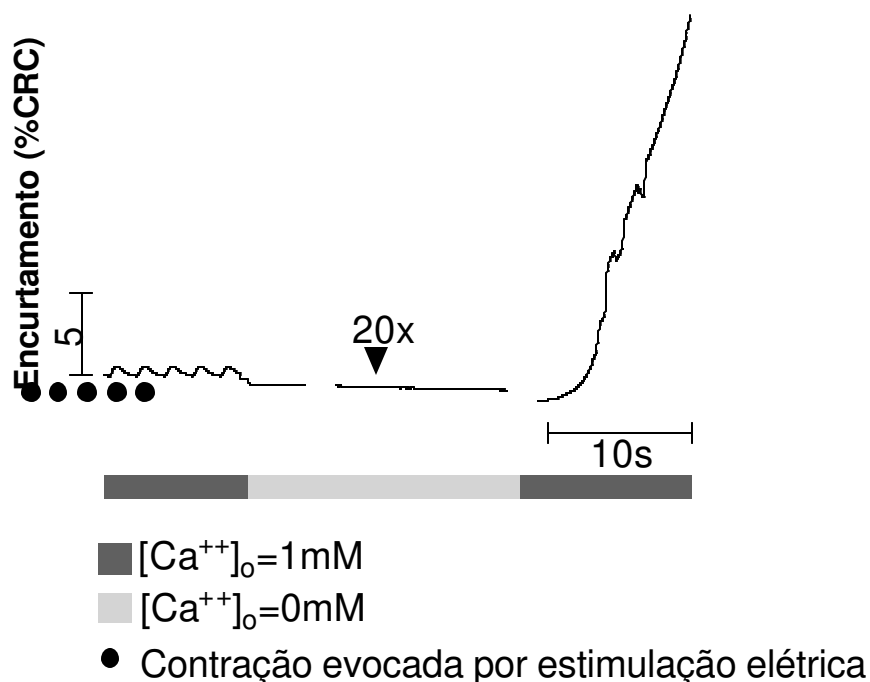


Figura 4.12: Registro do encurtamento celular, expresso como % do comprimento de repouso da célula (CRC), em resposta à aplicação de um campo elétrico de intensidade 20 vezes a do campo limiar, durante perfusão com solução sem Ca^{2+} . Observe que desenvolvimento de contratura não ocorreu imediatamente após a aplicação do estímulo, mas apenas depois do retorno à perfusão com meio contendo Ca^{2+} .

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5.1 – SISTEMA DE MICROSCOPIA

O sistema de microscopia desenvolvido é de baixo custo (~ R\$1.000,00, ou cerca de US\$ 300.00). Por meio do sistema pudemos localizar e visualizar os miócitos cardíacos, bem como medir seu comprimento e acompanhar o deslocamento de suas bordas.

O uso da objetiva de 10x facilitou a localização das células Transv ou Long na câmara de perfusão. A troca das objetivas pôde ser feita sem muita complicação e sem deslocamento do campo microscópico selecionado. A amplificação da objetiva de 32x, utilizada para fazer as medições de encurtamento celular, foi suficiente para que a célula ocupasse quase que totalmente a extensão do monitor.

5.2 – MEDIÇÃO DO CAMPO ELÉTRICO NO INTERIOR DA CÂMARA DE PERFUSÃO

O erro inferior a 2 % e a ausência de diferenças estatísticas entre as medidas experimentais do campo elétrico ao longo da área de trabalho, bem como entre os valores medidos e o campo estimado E , indicam que o campo elétrico é praticamente uniforme na região de trabalho, e que a aproximação do campo elétrico no interior da câmara de perfusão ao modelo do capacitor de placas paralelas é adequada. O pequeno erro detectado pode ser devido a vários fatores: a) os eletrodos não são planos, apesar da distância entre eles ser bem maior do que seus raios; b) o eletrodo de prova pode distorcer o campo em sua volta, ainda que seu diâmetro seja pequeno, comparado com as dimensões da câmara de perfusão; c) não uniformidade da altura da solução perto da saída da solução e do degrau da câmara de perfusão; e) erros inerentes aos instrumentos de medição; f)

o modelo utilizado para o cálculo de E não descreve perfeitamente a condição experimental.

Assim, consideramos como aceitável o modelo utilizado para estimativa do campo elétrico aplicado à preparação, apesar do campo elétrico ser distorcido pela presença de várias células; porém, nesta preparação não há como colocar uma só célula na câmara de perfusão. Procuramos utilizar o mínimo de células possível, a fim de minimizar a distorção do campo elétrico.

5.3 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS

5.3.1 – Limiar de Estimulação

A ΔV_T média foi, aproximadamente, 20 mV, independente da direção do campo elétrico aplicado, que está próxima ao valor encontrado na literatura para excitar o miocárdio ventricular de cobaias e gatos (18 mV, Kishida *et al.*, 1979), e em nosso laboratório (Ferraz, 2003). A ΔV_T está diretamente ligada à abertura de canais de Na^+ dependentes de tensão elétrica do sarcolema. Assim, quando a membrana é despolarizada e V_m atinge um determinado valor (limiar), há abertura de um número crítico de canais de Na^+ suficiente para o disparo de um PA (Garcia, 1997), independente da direção do campo elétrico aplicado.

O E_T de células Transv foi o dobro do valor para células Long, apesar da ΔV_{max} produzida pelo E_T não depender da orientação do campo elétrico. Este resultado está de acordo com dados da literatura (Bardou *et al.*, 1990; Tung *et al.*, 1991; Ranjan e Takor, 1995) e do nosso laboratório (Gomes, 1997; Lima, 1999). A diferença observada entre os valores de E_T pode ser explicada pelo fato de que a ΔV_m induzida pelo campo elétrico externo depende da geometria celular, e é tanto maior quanto maior for a projeção do comprimento da célula ao longo da direção de aplicação do campo (Klee & Plonsey, 1976; Tung *et al.*, 1991; Knisley *et al.*, 1993). Esta projeção diminui quando a direção do campo tende para a transversal ao eixo maior da célula, ou seja, quando o campo está paralelo ao menor eixo da célula, o que resulta no requerimento de um maior campo elétrico, quando comparado com uma estimulação longitudinal ao maior eixo da célula, para que seja atingida uma dada ΔV_T .

5.3.2 – Curvas de Letalidade

Antes da discussão sobre as curvas, é importante que sejam tecidos comentários sobre os mecanismos pelos quais campos elétricos são letais a células. Uma possibilidade é o aumento drástico da temperatura da solução devido ao campo elétrico de alta intensidade. Calculamos a variação de temperatura ($\Delta T = mc/Q$, onde m é a massa da solução, c é o calor específico da solução e Q é a energia aplicada) para o pior caso, ou seja, aplicação do maior campo elétrico possível com nossa instrumentação (200V/cm) na ausência de troca de solução da câmara. A ΔT estimada foi de 0,68 °C, valor este situado dentro da faixa de flutuação da temperatura ambiente. Como, com a perfusão, a solução da câmara é trocada totalmente a cada 7s, o aumento real de temperatura tenderia a ser menor ainda. Portanto, esta possibilidade parece improvável.

Outra possibilidade é o fenômeno da eletroporação, já discutido no Capítulo 1, que já está bem estabelecido na literatura (Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b; Krauthamer & Jones, 1997; Cheng *et al.*, 1999). Resumidamente, quando aplicamos campos elétricos de alta intensidade à célula, haveria uma grande ΔV_m que levaria à formação de poros na membrana, ocorrendo um desequilíbrio iônico/osmótico no citosol que causaria a morte celular. Assim, trabalhamos com esta hipótese.

O campo elétrico letal em células Transv (EL50 = 137,5 V/cm) foi cerca de 2 vezes aquele em células Long (67,6 V/cm), o que indica maior efeito letal do campo elétrico quando este é aplicado paralelamente ao eixo maior da célula. Portanto, campos de alta magnitude podem ser letais em células Long, mas não em células Transv (observação também relatada por Knisley & Grant, 1995). Por exemplo, um campo da ordem de 68 V/cm mata 50% das células quando sua aplicação é longitudinal, mas apenas 1% das células quando aplicado na direção transversal, de acordo com os dados da curva de letalidade da Figura 4.9.

A comparação com campos elétricos letais da literatura é viável somente se as dimensões celulares forem parecidas, pois o fenômeno da eletroporação está diretamente ligado à ΔV_m , que depende das dimensões celulares. Em nossos experimentos, 2c e 2a médios foram 115 e 29 μm , respectivamente. Para

aplicação no sentido longitudinal, Knisley & Grant (1995) estimaram como letais em células de coração de coelho ($2c = 111 \mu\text{m}$) campos de 100V/cm . Podemos verificar que o campo letal estimado por estes autores corresponde a 100% de letalidade em células Long no presente trabalho. A semelhança dos valores de intensidade letal entre células de diferentes espécies de mamíferos pode indicar que os resultados determinados em preparações de animais experimentais podem ser extrapolados para as células miocárdicas de humanos, cujas dimensões ($2c = 136 \mu\text{m}$ e $2a = 26 \mu\text{m}$, Zafeiridis *et al.*, 1998) são comparáveis àquelas de miócitos de rato.

Além da lesão da membrana celular, Jones *et al.* (1980) observaram, por meio de microscopia eletrônica, lesões nas mitocôndrias, na membrana nuclear e no RS, além de desorganização das miofibrilas, 30 s após um choque de 200V/cm .

Os campos elétricos desfibrilatórios chegam a mais de 100 V/cm perto dos eletrodos (Yabe *et al.*, 1990) e possuem duração de aproximadamente 10 ms (Tacker & Geddes, 1996). De acordo com nossos resultados, um campo desta ordem seria letal a aproximadamente 8% e 97% das células Transv e Long, respectivamente. Portanto, um campo desfibrilatório que recrutasse o maior número de células Transv do coração seria letal para praticamente todas as células Long. Assim, uma maneira de diminuir a lesão miocárdica durante a desfibrilação seria excitar o maior número possível de células Long com campos um pouco menores que os letais para as mesmas, pois estas, apesar de sua maior vulnerabilidade à intensidade do campo elétrico desfibrilatório, possuem um menor limiar de estimulação. Por outro lado, este campo desfibrilatório não seria suficiente para ser letal às células Transv, mas sim para estimulá-las. Porém, devido à não homogeneidade do tecido cardíaco, há a geração de gradientes de potencial elétrico não uniformes na estrutura cardíaca, não sendo suficiente aplicar campos próximos aos letais de células Long para a desfibrilação, pois, em algumas regiões do coração, o limiar de estimulação de células Transv não seria atingido. Uma forma de contornar esse problema seria mudar a estratégia de desfibrilação, estimulando o coração em varias direções com campos subletais,

mas bem superiores ao limiar. Deste modo, a maioria das células poderia ser estimulada na direção longitudinal com relação ao campo desfibrilatório aplicado.

Expressando os campos elétricos de alta intensidade como múltiplos do E_T , observamos que as curvas se aproximam, embora o campo letal médio permaneça diferente nos grupos Long e Transv. Apesar disto, esta diferença é inferior a 15%, e, portanto, muito menor do que aquela dos valores absolutos de E_T (diferença de ~100%). Portanto, poderíamos dizer que, guardadas as devidas ressalvas, os valores de campos letais mantêm uma estreita relação com os do campo estimulatório limiar. Expressar o campo como múltiplo do E_T torna-se uma ferramenta útil quando não se pode determinar o módulo e a direção do campo elétrico aplicado, como no caso do uso de câmaras de perfusão e eletrodos de configuração incompatível com algum modelo físico que permita estimativa aproximada do campo.

Tang *et al.* (1992) estimaram que campos desfibrilatórios chegam a ser cerca de 20 vezes maiores que o campo estimulatório limiar. De acordo com nossos resultados, campos desta ordem de grandeza seriam letais a mais de 50% das células, independente da orientação com relação ao campo.

Ao determinar as curvas de letalidade em função de ΔV_{max} , constatamos que os valores letais de ΔV_{max} (~ 263 a 562 mV, Figura 4.11) estão dentro da faixa em que ocorre eletroporação (150 mV a 1 V, Tsong, 1991; DeBruin & Krassowska, 1999), o que é sugestivo de que este fenômeno é provavelmente responsável pela letalidade.

Quando se compara as curvas de letalidade em função de ΔV_{max} e da intensidade absoluta do campo elétrico (Figuras 4.11 e 4.9, respectivamente), observa-se posições inversas das curvas das células Transv e Long. Em outras palavras, valores de ΔV_{max} letais a células Transv (menores que aqueles em células Long) requerem campos maiores do que os aplicados a células Long, o que indica uma maior sensibilidade do V_m ao campo elétrico quando este é aplicado na direção transversal. Isto se torna mais claro quando se observa, em uma célula hipotética (dimensões $2c = 115 \mu m$ e $2a = 29 \mu m$), a distribuição

espaial da ΔV_m , estimada pelas equações 3.8 e 3.10, que descrevem ΔV_m em células Transv e Long, respectivamente, normalizada pelo $\Delta V_{\max}$ (Figura 5.1).

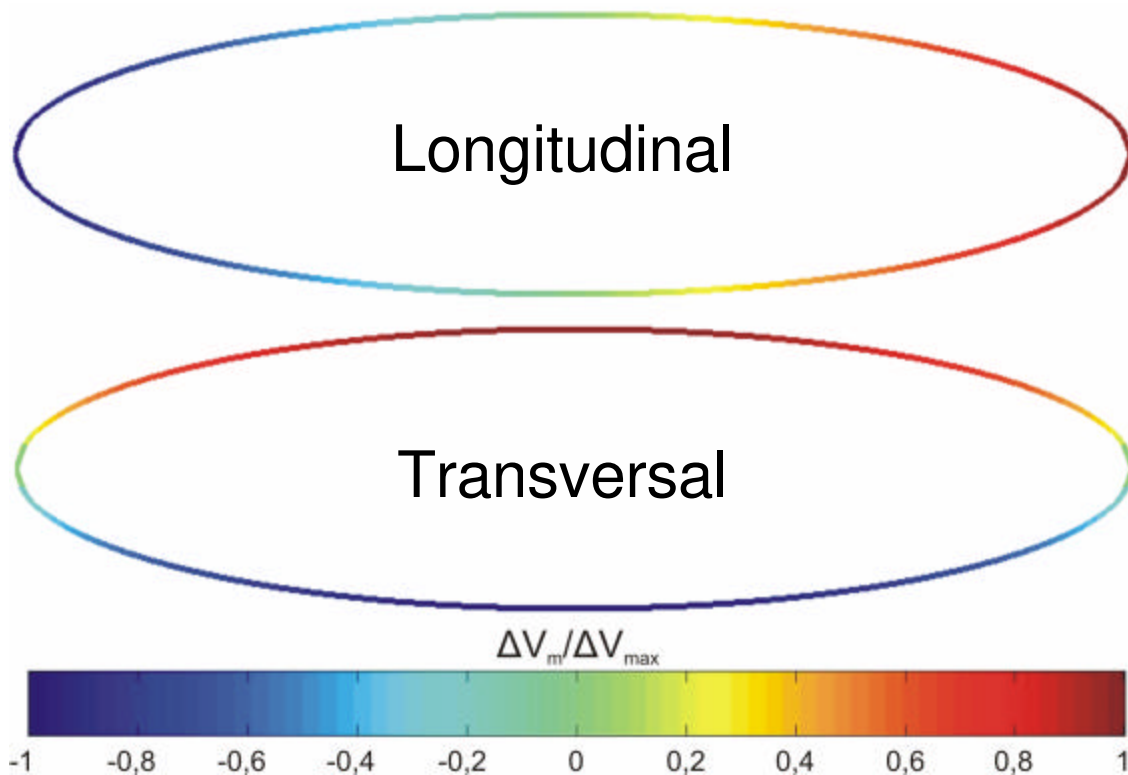


Figura 5.1: Distribuição espacial da variação do potencial transmembrana (ΔV_m) normalizada pela variação do potencial transmembrana máxima ($\Delta V_{\max}$) estimada em uma célula-modelo esferóide prolato, com dimensões médias de $2c = 115 \mu\text{m}$ e $2a = 29 \mu\text{m}$, para campos elétricos aplicados nas direções transversal e longitudinal, com relação ao maior eixo da célula.

Pode-se observar na Figura 5.1 que a área de membrana na qual ΔV_m é $\geq 99\%$ de $\Delta V_{\max}$ é maior para aplicação transversal do que longitudinal do campo (mais facilmente observável na Figura 5.2). Portanto, a maior sensibilidade ΔV_m ao campo elétrico aplicado na direção transversal pode ser devida ao fato de que quanto maior a ΔV_m , maior é a probabilidade de abertura de poros (Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b), e, portanto, quanto maior a área na qual ΔV_m é alta, maior seria o número de poros abertos. Deste modo, a desfibrilação recrutando a maior parte das células Long seria menos danosa porque, para um

mesmo $\Delta V_{\max}$, a ΔV_m em torno de $\Delta V_{\max}$ ocupa uma área menor, diminuindo a probabilidade de lesão celular.

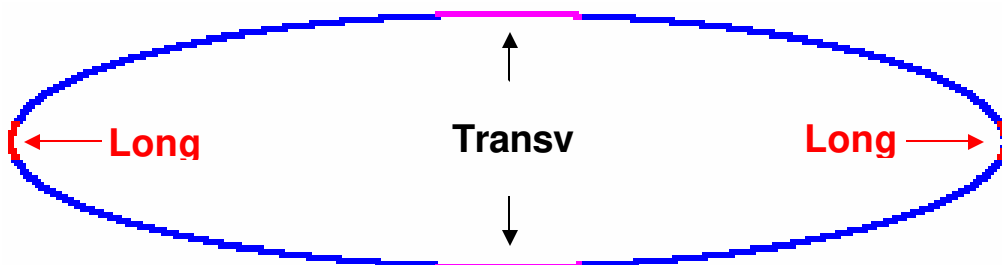


Figura 5.2: Representação semelhante à da Figura 5.1, mostrando as regiões da membrana onde ΔV_m é maior ou igual a 99% de $\Delta V_{\max}$ durante aplicação de campos elétricos nas direções longitudinal (Long, região em vermelho) e transversal (Transv, região em rosa). Em ambos os casos, $\Delta V_{\max}$ foi de 361,6 mV.

A ΔV_T foi semelhante em células Long e Transv, no entanto. Isto poderia ser explicado pelo fato de que a excitação e a letalidade, causadas por campos elétricos, tratam-se de fenômenos diferentes, apesar de ambos dependerem de ΔV_m . Como já discutido, a estimulação limiar está diretamente ligada à abertura de um número crítico de canais de Na^+ dependentes de tensão elétrica, presentes no sarcolema. Uma vez abertos, estes canais medeiam uma rápida e grande corrente despolarizante que é responsável pelo disparo de um PA, o qual se propaga rapidamente em toda a membrana da célula (o PA é um fenômeno auto-regenerativo: o disparo do PA num dado local da membrana leva disparo de outro PA em uma região vizinha). Porém, a letalidade está aparentemente ligada à formação de poros não seletivos na membrana, que formam circuitos de baixa resistência, e assim dificultam a própria variação de ΔV_m , e, portanto, a formação de novos poros (DeBruin & Krassowska, 1999). Ao contrário do PA, a eletroporação não parece ser auto-regenerativa e sim, provavelmente, auto-limitante, pelas razões expostas acima.

5.3.3 – Influencia da $[Ca^{2+}]_o$

A sobrecarga de Ca^{2+} pode gerar atividade espontânea em miócitos cardíacos e levar à morte celular (Bassani *et al.*, 1997; Bers, 2001; Bassani & Bassani, 2003). Consideramos que a contratura irreversível seja causada por sobrecarga de Ca^{2+} , uma vez que o Ca^{2+} é o agente que ativa o processo de contração celular. Assim, é importante investigar se esta sobrecarga é devida à entrada de Ca^{2+} do meio extracelular.

Os experimentos feitos com $[Ca^{2+}]_o$ virtualmente nula (a $[Ca^{2+}]_o$ estimada na solução sem Ca^{2+} contendo 1 mM EGTA é de cerca de 1 μ M) mostraram que a contração irreversível da célula ocorre somente na presença de concentração extracelular de Ca^{2+} na faixa milimolar (observado também por Knisley & Grant, 1995). Mas este resultado não é suficiente para que se possa afirmar que a lesão celular irreversível se deva ao influxo de íons Ca^{2+} através dos poros não seletivos (como concluído por Tung *et al.*, 1994 e Krauthamer & Jones, 1998). Ele nos permite afirmar apenas que é necessária a entrada de Ca^{2+} externo para que ocorra a morte celular, e que o campo elétrico de alta intensidade não lesa o RS a ponto de este liberar espontaneamente grande quantidade de Ca^{2+} . Lesões, como já mencionado, e alterações funcionais no RS foram observadas por Jones *et al.* (1980) e Jones & Narayanan (1998), respectivamente, após a aplicação de choques de alta intensidade. A sobrecarga citosólica de Ca^{2+} poderia ser devida à entrada dos íons pelos canais de Ca^{2+} do sarcolema, pela NCX funcionando no modo reverso, pela liberação de Ca^{2+} do RS disparada pela entrada de Ca^{2+} externo, pela liberação de Ca^{2+} da mitocôndria, pela entrada dos íons por meio de poros não seletivos (eletroporação) ou pela combinação de mais de um destes mecanismos.

Tovar & Tung (1992), estudando miócitos cardíacos de rã, investigaram a hipótese de que a sobrecarga de Ca^{2+} do citosol se deva a influxo do íon através dos canais de Ca^{2+} do sarcolema, e observaram que, a partir de uma V_m de 0,4 V, Ca^{2+} entra na célula mesmo na presença de bloqueador destes canais (Cd^{2+} , 1 mM e Ni^{2+} , 1 mM).

Jones *et al.* (1987) detectaram a formação de poros com diâmetros de 45 a 60 Å após a aplicação de um campo de 200 V/cm a cultura de células cardíacas de embrião de ave, com base na entrada de moléculas de dextranos com dimensões conhecidas, marcadas com isotiocianato de fluoresceína. Estes poros seriam de tamanho mais que o suficiente para a entrada de Ca^{2+} , que possui um raio iônico de 0,94 Å (Mahan, 1991).

Mesmo assumindo que o fenômeno da eletroporação tenha ocorrido e que a quantidade de Ca^{2+} que tenha entrado pelos canais de cálcio do sarcolema fosse mínima no experimento com solução sem CaCl_2 , não podemos descartar a influência dos outros mecanismos de aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na contração irreversível (NCX, RS e mitocôndrias). Porque a abertura de poros pode ser reversível (Tsong, 1991; Weaver, 1994; Weaver & Chizmadzhev, 1996a, b), não podemos afirmar que o aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocorreu pela entrada de Ca^{2+} através de poros não seletivos. Assim, a contração irreversível pode ter ocorrido devido a um desequilíbrio iônico no citosol causado pela eletroporação e mantido após o fechamento dos poros. Este desequilíbrio poderia facilitar o aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por outros mecanismos (NCX, RS e mitocôndria). Assim, precisamos de mais experimentos para identificar o(s) mecanismo(s) envolvidos na geração da contratura irreversível.

5.3.4 - Extensão dos Presentes Resultados ao Músculo Cardíaco

Soares (2003) observou que campos elétricos de 220 V/cm foram capazes de deprimir irreversivelmente a atividade contrátil em músculo atrial isolado de rato e, em alguns casos, eliminá-la por completo, resultando numa contratura sustentada após o choque. Ele também observou que, após aplicação de choques de 130 V/cm, a tensão diastólica aumentava, o que pode ser indicativo de acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma. Após aplicação de choques de 130 V/cm na ausência de Ca^{2+} externo, nada ocorria com a tensão diastólica, mas, logo após o retorno da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ para 1,5 mM, a tensão diastólica se elevou. Estes resultados estão de acordo com os nossos resultados obtidos em células, ou seja, que um campo de 220 V/cm é letal em todas as células, e um campo de 130 V/cm é letal em cerca

de 38% das células Transv. A proximidade de equivalência dos nossos dados obtidos em células isoladas aos dados de preparações multicelulares indica que os valores aqui encontrados poderão eventualmente ser extrapolados para o coração inteiro.

5.4 – Resumo e Conclusões

O desenvolvimento de instrumentação, como a câmara de perfusão, o sistema de microscopia e a bancada de trabalho, e de metodologia específica permitiram quantificar a relação entre a letalidade e a intensidade do campo elétrico aplicado e $\Delta V_{\max}$ de maneira probabilística, que permite análise estatística para comparação entre grupos experimentais, ao contrário de outros estudos (Knisley & Grant, 1995; Cheng *et al.*, 1999) que não utilizam a abordagem probabilística. Uma investigação futura mais detalhada de possíveis mecanismos associados à morte celular, como a NCX e a liberação de Ca^{2+} do RS, poderá ser realizada com nossa abordagem e montagem experimental, com modificações mínimas na metodologia.

Em nosso estudo, além de analisarmos o efeito da direção de aplicação do campo e da $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sobre o efeito letal de campos elétricos, o que também foi investigado por Knisley & Grant (1995), quantificamos o campo elétrico letal em duas direções, o que nos permitiu concluir que campos elétricos de magnitude semelhante a campos desfibrilatórios podem lesar miócitos cardíacos de modo irreversível, e que, portanto, o processo desfibrilatório precisa e pode ser modificado.

Ao expressarmos o campo como múltiplo do E_T , descobrimos uma ferramenta útil para o estudo de células submetidas a campos elétricos de alta intensidade quando não se pode determinar o módulo e a direção do campo elétrico aplicado. Esta ferramenta já está sendo utilizada em nosso laboratório, com resultados positivos.

Ao estimarmos a ΔV_m letal, pudemos inferir que o V_m é mais sujeito a variação quando o campo elétrico é aplicado na direção perpendicular do que na

direção paralela ao eixo maior da célula. Esta é uma observação original, embora este aspecto requeira maiores estudos para esclarecimento de suas bases físicas.

Esperamos que a metodologia e os resultados obtidos no presente trabalho possam ser aproveitados em futuros estudos com campos de alta intensidade e levados em conta no desenvolvimento de desfibriladores mais eficientes.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Aidley, D.J. The Physiology of Excitable Cells. Cambridge University Press, Cambridge, USA, 1989.

-Al-Khadra, A., Nikolski, V., Efimov, I.R., The role of electroporation in defibrillation. *Circ. Res.*, 87: 797-804, 2000.

-AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart disease and stroke statistics – 2004 update. Disponível em: <<http://www.americanheart.org>> Acesso em 04 maio.2004.

-Avitall, B.; Port, S.; Gal, R.; McKinnie, J.; Tchou, P.; Jazayeri, M.; Troup, P.; Aktar, M. Automatic implantable cardioverter / Defibrillator discharges and acute myocardial injury. *Circulation*, 81: 1482-1487, 1990.

-Bardou A.L.; Chenais J.M.; Birkui P.J.; Govaere M.C.;Auger P.M.; Von E.D.; Degonge J. Directional variability of stimulation threshold measurements in isolated guinea pig cardiomyocytes. *PACE*; 13: 1590-1595, 1990.

-Bassani, J.W.M; Bassani, R.A. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump with thapsigargin to estimate the contribution of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange to ventricular myocyte relaxation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36: 1717-1723, 2003.

-Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A. Contribution of Ca^{2+} transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *Am. J. Physiol.*, 282: 2406-2413, 2002.

-Bassani, R.A.; Bassani, J.W.M; Lipisius, S.L.; BERS, D.M.; Diastolic Ca efflux from SR in atrial pacemaker cells and Ca-overloaded myocytes. *Am. J. Physiol.*, 273: 886-892, 1997.

-Bassani, R.A.; Bassani, J.W.M.; Bers, D.M. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.*, 453: 591-608, 1992.

-Bassani, J.W.M.; Bassani, R.A.; Bers, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.*, 476: 279-293, 1994.

- Bers, DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2 ed. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- Capogrossi MC, Kort AA, Spurgeon HA, Lakatta EG. Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the Ca^{2+} - and species-dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle. *J. Gen. Physiol.* 88: 589-613, 1986.
- Cheek, E.R.; Fast, V.G. Nonlinear changes of transmembrane potential during electrical shocks. Role of membrane electroporation. *Circ. Res.*, 94: 208-214, 2004.
- Cheng, D.K.L.; Tung, L.; Sobie, E.A. Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. *Am. J. Physiol.*, 46: H351-H362, 1999.
- Dahl, C.F.; Ewy G.A.; Warner E.D.; Thomas E.D. Myocardial necrosis from direct current countershock: effect of paddle electrode size and time interval between discharges. *Circulation*, 50: 956-961, 1974.
- DeBruin, K.A.; Krassowska, W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. *Biophys. J.*, 77: 1213-1224, 1999.
- Eisenberg, M.S.; Copass, M.K.; Hallstrom, A.P.; Blake, B.; Bergne, L.; Short, F.A.; Cobb, L. A. Treatment of out-of-hospital cardiac arrest with rapid defibrillation by emergency medical technicians. *N.Engl. J. Med.*, 302: 1379-1383, 1980.
- Ferraz, S.A. Estimativa do influxo de cálcio por meio de canais tipo L em miócitos cardíacos isolados de ratos em desenvolvimento e adultos. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2003.
- Freeman, AS; Wang, MA; Weaver, JC. Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore separation. *Biophys. J.*, 67: 42-56, 1994.
- Garcia, E.A.C. Biofísica. Sarvier, São Paulo, Brasil, 1997.
- Gazmuri R.J.; Weil, MH.; Bisera, J.; Tang, W.; Fukui, M; McKee, D. Myocardial dysfunction after successful resuscitation from cardiac arrest. *Crit. Care Med.*, 24: 992-1000, 1996.
- Gomes, P.A.P. Aplicação de técnicas de engenharia no estudo de células cardíacas isoladas: Medição de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e limiar de estimulação. Tese de doutoramento. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 1997.

-Gomes, P.A.P., Bassani, R.A.; Bassani J.W.M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during post-natal development. *IEEE – Trans. on Biomed. Engin.* 46:630-636, 2001.

-Ideker, R.E.; Alfernes, C.; Krassowska, W.; Smith, W.M., Current concepts for selecting the location, size, and shape of defibrillation electrodes. *Pacing Clin. Electrophysiol.*, 14: 227-240, 1991.

-Jones, J.L., Jones R.E., Balasky G. Microlesion formation in myocardial cells by high-intensity electric field stimulation. *Am. J. Physiol.*, 0363-6135/87: H480-H486, 1987.

-Jones, J.L., Lepeschkin E., Jones R.E., Rush S. Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation. *Am. J. Physiol.*, 235: H214-H222, 1978.

-Jones, J.L.; Proskaver, C.C.; Paull, W.K.; Lepeschkin, E.; Jones, R.E. Ultrastructural injury to chick myocardial cells in vitro following “electric countershock”. *Circ. Res.*, 46: 387-394, 1980.

-Jones, J.L., Tovar O.H. The mechanism of defibrillation and cardioversion. *Proc. IEEE*, 84: 392-403, 1996.

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

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

-Knisley, S.B.; Blitchington T.F.; Hill B.C.; Grant, A.O.; Smith W.M.; Pilkington TC; Ideker RE. Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells. *Circ Res*; 72: 255-270, 1993.

-Knisley, S.B.; Grant, A.O. Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes. *J. of Mol. Cel. Cardiol.*, 27: 1111-1122, 1995.

-Knisley, S.B., Trayanova, N., Aguel, F., Roles of Electric Field and Fiber Structure in Cardiac Electric Stimulation. *Biophys. J.*, 77: 1404 -1417, 1999.

-Krauthamer, V.; Jones, J.L. Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks. *Life Sci.* 60: 1977-1985, 1997.

-Krauthamer, V.; Jones, J.L. Effects of biphasic electric shocks on calcium changes in cultured cardiac myocytes. *In Vitro and Mol. Toxicol.* 11: 221-228, 1998.

- Larsen, M.P.; Eisenberg, M.S.; Cummins, R.O.; Hallstrom, A.P. Predicting survival from out-of-hospital cardiac arrest: a graphic model. *Ann. Emerg. Med.*, 22: 1652-1658, 1993.
- Li, H.G.; Jones, D.L.; Yee, R.; Klein, G.J. Defibrillation shocks increase myocardial pacing threshold: an intracellular microelectrode study. *Am. J. Physiol.*, 260: H1973-H1979, 1991.
- Lima, K.A. Efeito da direção do campo elétrico sobre o limiar de estimulação de miócitos ventriculares isolados. Tese de mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 1999.
- Mahan, B.H. Mahan Química: um Curso Universitário. Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, Brasil, 1991.
- Malmivuo, J.; Plonsey, R. Bioelectromagnetism. Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. Oxford University Press, New York, USA, 1995.
- O'Neil, R.J.; Tung, L., Cell-attached patch clamp study of the electroporation of amphibian cardiac cell. *Biophys. J.*, 59: 1028-1039, 1991.
- Opie, L.H. The Heart: Physiology from Cell to Circulation. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publ. 1998.
- Ranjan, R.; Thakor, N.V. Electrical stimulation of cardiac myocytes. *Ann. Biom. Engin.* 23: 812-821, 1995.
- Smith, K.C.; Neu, J.C.; Krassowska, W. Model of creation and evolution of stable electropores for DNA delivery. *Biophys J.*, 86: 2813-2826, 2004.
- Soares, G.S. Comprometimento contrátil do tecido cardíaco isolado após estimulação com campo elétrico de alta intensidade. Tese de mestrado. Departamento de Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2003.
- Tacker, W.A.; Geddes, L.A. The laws of electrical stimulation of cardiac tissue. *Proc. IEEE*, 84: 355-365, 1996.
- Tang, W.; Weil M.H.; Sun S.; Gazmuri R.J.; Bisera J. Progressive myocardial dysfunction after cardiac resuscitation. *Crit. Care Med.*, 21: 1046-1050, 1993.
- Tang, A.S.L.; Wolf, P.D.; Afework, W.M.; Smith, W.M.; Ideker, R.E. Three-dimensional potential gradient fields generated by intracardiac catheter and cutaneous patch electrodes. *Circulation*, 85: 1857-1864, 1992.

- Tovar, O.; Tung, L. Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses. *Am. J. Physiol.*, 263: H1128-H1136, 1992.
- Trafford A.W., Díaz M.E., Negretti N., Eisner D.A. Enhanced Ca^{2+} current and decreased Ca^{2+} efflux restore sarcoplasmic reticulum content after depletion. *Circ. Res.*, 81: 477-484, 1997.
- Tsong, T.Y. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.*, 60: 297-306, 1991.
- Tung, L.; Sliz, N.; Mulligan, MR. Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circ. Res.*, 69:722-730, 1991.
- Tung, L.; Tovar, O., Neunlist, M.; Jain, S.K; O'Neill, R.J. Effects of strong electrical shock on cardiac muscle tissue. *Ann. NY Acad. Sci.*, 720:160-175, 1994.
- Weaver, J.C. Molecular basis for cell membrane electroporation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 720: 141-152, 1994.
- Weaver, J.C.; Chizmadzhev, Y. Electroporation. In: Polk, C.; Postow, E. (Ed.). Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields. 2. ed. Boston: CRC Press, 1996 a. p. 247 – 274.
- Weaver, J.C.; Chizmadzhev, Y. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41: 135-160, 1996b.
- Weaver, W.D.; Cobb, L.A.; Copass, MK.; Hallstrom, AP. Ventricular defibrillation – a comparative trial using 175-J and 320-J shocks. *N. Engl. J. Med.*, 307:1102-1112, 1982.
- Yabe, S.; Smith, W.M.; Daubert, J.P.; Wolf, P.D.; Rollins, D.L.; Ideker, R.E. Conduction disturbances caused by high current density electric fields. *Circ. Res.*, 66: 1191-1203, 1990.
- Xie, J.; Weil, M.H.; Sun, S.; Tang, W.; Sato, Y.; Jin, X.; Bisera, J. High-energy defibrillation increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation*, 96:683-688, 1997.
- Zafeiridis, A.; Jeevanandam, M.D.; Houser, S.R.; Margulies, M.D. Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation*, 98: 656-662, 1998.

APÊNDICE - A

DADOS DE CÉLULAS INDIVIDUAIS

Neste apêndice apresentamos os valores individuais dos parâmetros calculados a partir das medições e dimensões das células. Com estes dados é possível a reprodução integral de todos os resultados encontrados no presente trabalho.

Tabela A1. Dimensões celulares (2a e 2c), campo elétrico (E_T) e variação máxima do potencial transmembrana (ΔV_T) no limiar de estimulação. Os cálculos são efetuados para células orientadas nas direções transversal e longitudinal ao campo elétrico aplicado.

Células na direção transversal					Células na direção longitudinal				
Célula	E_T (V/cm)	ΔV_T (mV)	2a(um)	2c(um)	célula	E_T (V/cm)	ΔV_T (mV)	2a(um)	2c(um)
T1	8,93	23,18	27,80	115,79	L1	3,73	21,62	27,00	107,37
T2	7,47	15,38	21,70	111,58	L2	3,52	24,24	30,40	128,42
T3	7,33	15,61	22,60	105,26	L3	5,33	25,56	31,30	83,87
T4	8,00	22,64	30,40	123,16	L4	3,73	27,17	34,80	134,41
T5	8,13	19,28	25,20	114,74	L5	2,13	12,20	33,90	102,15
T6	5,47	11,41	22,60	84,21	L6	2,19	18,68	33,00	161,29
T7	5,47	17,90	37,40	89,47	L7	3,68	26,69	22,60	139,00
T8	6,93	21,92	34,80	110,53	L8	3,09	21,03	31,30	125,81
T9	7,87	18,53	25,20	107,37	L9	3,73	19,70	26,09	96,77
T10	7,07	18,92	28,70	118,95	L10	2,35	12,37	25,78	96,77
T11	7,60	19,50	27,00	141,05	L11	1,87	11,08	32,00	107,53
T12	8,53	23,18	28,70	142,11	L12	3,13	21,23	23,11	129,03
T13	5,73	18,53	36,50	94,74	L13	3,79	22,98	26,67	112,90
T14	8,40	21,07	27,00	107,37					
T15	7,07	15,20	22,60	121,05					
T16	5,47	18,91	38,30	115,79					
T17	7,60	21,47	30,40	121,05					

Tabelas A2. Probabilidades de letalidade (média $\pm$ erro-padrão da média) em função da intensidade do campo elétrico, determinados em células orientadas nas direções transversal e longitudinal à direção de aplicação do campo elétrico.

Células na direção transversal		Células na direção longitudinal	
E(V/cm)	Probabilidade de letalidade	E(V/cm)	Probabilidade de letalidade
0,00	0,00	0	0,00
43,73	0,00	42,24	0,00
45,87	0,00	42,67	0,00
55,47	0,00	43,73	0,00
59,73	0,00	44,16	0,00
62,93	0,00	44,8	0,00
65,07	0,00	46,67	0,00
65,60	0,00	46,93	0,00
87,47	0,04 $\pm$ 0,04	49,49	0,00
91,73	0,08 $\pm$ 0,05	50,13	0,00
100,80	0,08	53,33	0,06 $\pm$ 0,06
102,40	0,08	54,67	0,12 $\pm$ 0,08
106,00	0,08	56	0,18 $\pm$ 0,09
109,33	0,16 $\pm$ 0,08	56,32	0,24 $\pm$ 0,10
113,07	0,21 $\pm$ 0,08	58,67	0,29 $\pm$ 0,11
113,07	0,21	59,73	0,35 $\pm$ 0,12
114,00	0,21	61,87	0,42 $\pm$ 0,12
117,33	0,21	62,67	0,48 $\pm$ 0,12
119,47	0,27 $\pm$ 0,09	64	0,48
121,60	0,32 $\pm$ 0,10	73,6	0,56 $\pm$ 0,13
134,40	0,38 $\pm$ 0,11	74,67	0,63 $\pm$ 0,12
136,53	0,43 $\pm$ 0,11	75,73	0,63
138,67	0,49 $\pm$ 0,11	85,33	0,75 $\pm$ 0,13
141,33	0,55 $\pm$ 0,12	93,33	0,88 $\pm$ 0,11
142,93	0,55	94,67	1,00
144,00	0,55		
146,67	0,62 $\pm$ 0,12		
152,00	0,70 $\pm$ 0,12		
157,33	0,77 $\pm$ 0,11		
160,00	0,85 $\pm$ 0,10		
160,80	0,92 $\pm$ 0,07		
162,67	1,00		

Tabela A3. Campos elétricos sub-letais máximos (0), letais (1), e probabilidades de letalidade (PL, média $\pm$ erro-padrão da média) em função da intensidade do campo elétrico, determinados em células orientadas nas direções transversal (n = 17) e longitudinal (n = 13) à direção de aplicação do campo elétrico. O campo elétrico foi expresso como um múltiplo do campo limiar (x Limiar) em cada célula.

Células na direção transversal					Células na direção transversal				
Intervalo de letalidade			Pontos da curva de letalidade		Intervalo de letalidade			Pontos da curva de letalidade	
Células	E (xLimiar)	0-1	E (xLimiar)	PL	Células	E (xLimiar)	0-1	E (xLimiar)	PL
T1	16	0	0	0	L1	12	0	0	0
	18	1	8	0		16	1	12	0
T2	8	0	12	0	L2	12	0	16	0,14 $\pm$ 0,07
	16	1	15	0		16	1	20	0,35 $\pm$ 0,11
T3	16	0	16	0,33 $\pm$ 0,10	L3	12	0	25	0,81 $\pm$ 0,11
	20	1	18	0,39 $\pm$ 0,11		16	1	30	1
T4	18	0	20	1,00 $\pm$ 0,00	L4	16	0		
	20	1				20	1		
T5	8	0			L5	20	0		
	20	1				25	1		
T6	8	0			L6	20	0		
	20	1				25	1		
T7	8	0			L7	12	0		
	20	1				20	1		
T8	8	0			L8	16	0		
	20	1				20	1		
T9	8	0			L9	20	0		
	20	1				25	1		
T10	15	0			L10	20	0		
	16	1				25	1		
T11	15	0			L11	25	0		
	16	1				30	1		
T12	12	0			L12	16	0		
	16	1				20	1		
T13	8	0			L13	20	0		
	16	1				25	1		
T14	12	0							
	16	1							
T15	16	0							
	20	1							
T16	12	0							
	16	1							
T17	15	0							
	20	1							

Tabela A4. Campos elétricos sub-letais máximos (0), letais (1), e probabilidades de letalidade (PL, média $\pm$ erro-padrão da média) em função da variação máxima do potencial transmembrana ($\Delta V_{\max}$), determinados em células orientadas nas direções transversal (n = 17) e longitudinal (n = 13) à direção de aplicação do campo elétrico.

Células na direção transversal					Células na direção transversal				
Intervalo de letalidade			Pontos da curva de letalidade		Intervalo de letalidade			Pontos da curva de letalidade	
Células	$\Delta V_{\max}$ (mV)	0-1	$\Delta V_{\max}$ (mV)	PL	Células	$\Delta V_{\max}$ (mV)	0-1	$\Delta V_{\max}$ (mV)	PL
T1	370,91	0	0	0	L1	12	0	0	0
	417,27	1	91,28	0		16	1	244,03	0
T2	123,05	0	123,05	0	L2	12	0	247,36	0
	246,10	1	143,21	0		16	1	259,49	0
T3	249,76	0	148,23	0	L3	12	0	277,05	0
	312,20	1	148,26	0		16	1	290,83	0
T4	407,49	0	154,22	0	L4	16	0	305,04	0,05 + 0,05
	452,77	1	175,35	0		20	1	306,67	0,05
T5	154,22	0	226,87	0	L5	20	0	309,2	0,10 + 0,07
	385,54	1	228,21	0,04 + 0,04		25	1	320,28	0,1
T6	91,28	0	243,19	0,04	L6	20	0	332,46	0,15 + 0,08
	228,21	1	246,1	0,08 + 0,05		25	1	336,55	0,15
T7	143,21	0	249,76	0,08	L7	12	0	339,7	0,15
	358,02	1	252,86	0,08		20	1	345,98	0,21 + 0,09
T8	175,35	0	278,14	0,08	L8	16	0	373,63	0,21
	438,38	1	283,81	0,08		20	1	387,77	0,28 + 0,11
T9	148,26	0	292,43	0,08	L9	20	0	394,08	0,28
	370,65	1	296,46	0,13 + 0,07		25	1	408,89	0,35 + 0,12
T10	283,81	0	302,5	0,18 + 0,08	L10	20	0	420,69	0,42 + 0,13
	302,73	1	302,73	0,23 + 0,09		25	1	424,63	0,49 + 0,13
T11	292,43	0	303,98	0,28 + 0,10	L11	25	0	434,67	0,49
	311,93	1	311,93	0,33 + 0,10		30	1	459,68	0,49
T12	278,14	0	312,2	0,39 + 0,11	L12	16	0	467,03	0,60 + 0,14
	370,85	1	322,11	0,39		20	1	492,6	0,70 + 0,14
T13	148,23	0	337,14	0,44 + 0,11	L13	20	0	533,79	0,80 + 0,12
	296,46	1	358,02	0,50 + 0,11		25	1	543,33	0,90 + 0,09
T14	252,86	0	370,65	0,55 + 0,11				574,6	1
	337,14	1	370,85	0,61 + 0,11					
T15	243,19	0	370,91	0,61					
	303,98	1	385,54	0,67 + 0,11					
T16	226,87	0	407,49	0,67					
	302,50	1	417,27	0,76 + 0,11					
T17	322,11	0	429,48	0,84 + 0,10					
	429,48	1	438,38	0,92 + 0,08					
			452,77	1,00 + 0,00					