GUSTAVO SHIMABUKURO MARCHINI

**ALTERAÇÕES NA CONTRATILIDADE CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE
DIABETES MELLITUS**

São Paulo
2018

GUSTAVO SHIMABUKURO MARCHINI

**ALTERAÇÕES NA CONTRATILIDADE CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE
DIABETES MELLITUS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2018

GUSTAVO SHIMABUKURO MARCHINI

**ALTERAÇÕES NA CONTRATILIDADE CARDÍACA EM MODELO ANIMAL DE
DIABETES MELLITUS**

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Engenharia Biomédica

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Idágene Aparecida Cestari

Coorientador:
Prof. Dr. Ismar Newton Cestari

São Paulo
2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Shimabukuro Marchini, Gustavo

Alterações na Contratilidade Cardíaca em Modelo Animal de Diabetes Mellitus / G. Shimabukuro Marchini, I. Newton Cestari, I. Aparecida Cestari -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

97 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle.

1.Bioengenharia 2.Ratos Wistar 3.Diabetes Mellitus 4.Células Musculares 5.Ecocardiografia I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle II.t. III.Newton Cestari, Ismar IV.Aparecida Cestari, Idágene

Dedico este trabalho à toda minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Reinaldo e Suely, pelo incondicional apoio durante todos estes anos.

À professora Dra. Idágene Cestari e Dr. Ismar Cestari pela oportunidade e orientação e por me ensinarem o que é a pesquisa.

À Yuka, por todo carinho e companheirismo nestes últimos três anos.

Aos amigos Daniel e Douglas que estiveram ao meu lado durante estes anos.

Ao Lucas por todas as conversas e ajuda nos experimentos e ao Roozbeh, pela parceria e pelas conversas.

A todos os colegas da Divisão de Bioengenharia do InCor, Helena, Priscila, Simão, Josevan, Milton, João, Luiz, Eduardo, Marcelo, Marina e Simone pela prestatividade durante todos estes anos.

Ao Daniel Tamashiro pela ajuda em diversas partes deste projeto.

A todos os profissionais do Biotério do InCor, em especial ao Dario e ao Vicente.

À Dra. Vera e ao Leonardo pelo auxílio com o ecocardiograma.

Ao Alexandre e seus alunos pela ajuda com os eletrocardiogramas.

À Paula e Aline pela grande ajuda nos experimentos de indução da diabetes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Processo 2013/24543-3).

A todos os não citados aqui mas que contribuíram de forma direta ou indireta com este trabalho.

"O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria"
(Isaac Asimov)

RESUMO

Introdução: A diabetes mellitus (DM) está entre as 10 principais causas de morte global e é considerada um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que 425 milhões de pessoas possuem esta doença e seu tratamento é considerado uma das prioridades de saúde. No coração, as alterações a nível celular causadas pela DM levam ao surgimento de anormalidades estruturais e funcionais que resultam na chamada cardiomiopatia diabética. A DM pode ser estudada a partir de modelos experimentais em animais, como a DM induzida pela estreptozotocina, uma substância citotóxica para as células pancreáticas que produzem insulina. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a existência de alterações cardíacas precoces na contratilidade de miócitos isolados, na morfologia e função cardíaca por ecocardiograma de alta resolução e na atividade elétrica do coração. **Metodologia:** Foram utilizados ratos Wistar machos para indução da DM com estreptozotocina. Os cardiomiócitos foram isolados por dissociação enzimática utilizando-se a preparação de Langendorff e a contratilidade estudada através da medição da variação do comprimento da célula e dos sarcômeros de cardiomiócitos estimulados eletricamente. A avaliação da morfologia e da função cardíaca foi feita por ecocardiografia de alta resolução e o eletrocardiograma foi obtido nos animais anestesiados. **Resultados:** A DM resultou em alteração da contratilidade dos cardiomiócitos medida pela variação do comprimento da célula e pela variação do comprimento do sarcômero. Comparados aos controles, os animais diabéticos apresentaram aumento dos intervalos de tempo para atingir o pico de contração (0,049 vs 0,068 s, e 0,043 vs 0,063 s, $P < 0,001$) aumento do relaxamento (0,028 vs 0,038 s e 0,025 vs 0,035 s, $P < 0,03$) e do intervalo até a máxima velocidade de encurtamento (0,019 vs 0,024 s, $P < 0,001$) e relaxamento (0,021 vs 0,032 s e 0,020 vs 0,025 s, $P < 0,03$) em relação ao grupo controle medidos pelo comprimento da célula e pelo comprimento do sarcômero, respectivamente. O ecocardiograma evidenciou mudanças morfológicas com aumento do diâmetro diastólico (24,4 vs 28,0 mm/kg, $P < 0,01$) e sistólico (11,0 vs 18,2 mm/kg, $P < 0,01$), aumento da massa do ventrículo esquerdo (1,9 vs 2,5 mg/g, $P < 0,02$) e manutenção da espessura relativa da parede posterior, caracterizando um quadro de hipertrofia excêntrica. Foram também observadas mudanças funcionais, como a diminuição significativa da fração de ejeção (73,4 vs 62,1%, $P < 0,01$), da fração de encurtamento (44,2 vs 34,7%, $P < 0,01$) e da onda S' (46,9 vs 38,1 mm/s, $P < 0,01$) avaliada pelo Doppler tecidual, indicando uma disfunção sistólica inicial nesse modelo experimental. No eletrocardiograma foi possível verificar um aumento na duração da onda P (9,15 vs 14,15 ms, $P < 0,005$). **Conclusão:** Os resultados obtidos permitiram identificar alterações precoces nesse modelo de DM. Foi observada uma correlação entre as alterações da contratilidade observadas diretamente ao nível celular através da medição da variação do comprimento da célula e do sarcômero com as alterações na morfologia e função cardíaca em decorrência da DM.

Palavras-chave: Bioengenharia. Diabetes mellitus. Células musculares. Ecocardiografia.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is among the top 10 causes of global death and is considered a major risk factor for cardiovascular disease. Data from the International Diabetes Federation indicate that 425 million people have this disease and its treatment is considered one of the health priorities. In the heart, changes at the cellular level caused by DM lead to the appearance of structural and functional abnormalities that result in so-called diabetic cardiomyopathy. DM can be studied from experimental models in animals including induction by streptozotocin, a cytotoxic substance for pancreatic cells that produce insulin. **Objectives:** The objective of this study was to evaluate the existence of early cardiac changes in the contractility of isolated myocytes, in the morphology and cardiac function by high resolution echocardiogram and in the heart electrical activity. **Method:** Male Wistar rats were used for induction of DM with streptozotocin. Cardiomyocytes were isolated by enzymatic dissociation using the Langendorff preparation and the contractility studied by measuring cell and sarcomere length variation in electrically stimulated cardiomyocytes. The evaluation of cardiac morphology and function was performed by high resolution echocardiogram and electrocardiogram was obtained in anesthetized animals. **Results:** DM resulted in alteration of cardiomyocyte contractility with measurement of cell length variation and with sarcomere length variation. Compared to controls, diabetic animals presented an increase in the time intervals to reach the peak of contraction (0.049 vs 0.068 s and 0.043 vs 0.063 s, $P<0.001$) increase in relaxation (0.028 vs 0.038 s and 0.025 vs 0.035 s, $P<0.03$) and the intervals until the maximum shortening velocity (0.019 vs 0.024 s, $P<0.001$) and relaxation (0.021 vs 0.032 s and 0.020 vs 0.025 s, $P<0.03$) in relation to the control group measured by length and by sarcomere, respectively. The echocardiogram evidenced morphological changes with an increase in the diastolic (24.4 vs 28.0 mm/kg, $P<0.01$) and systolic diameter (11.0 vs 18.2 mm/kg, $P<0.01$) increase in left ventricle mass (1.9 vs 2.5 mg/g, $P<0.02$) and maintenance of the relative thickness of the posterior wall in relation to the control group, characterizing eccentric hypertrophy in DM. Functional changes were also observed, such as a significant reduction in ejection fraction (73.4 vs 62.1 %, $P<0.01$), of the fractional shortening (44.2 vs 34.7 %, $P<0.01$) and the S' wave (46.9 vs 38.1 mm/s, $P<0.01$) evaluated by tissue Doppler, indicating an initial systolic dysfunction in this experimental model. With the electrocardiogram it was possible to verify an increase in P wave duration (9.15 vs 14.15 ms, $P<0.005$). **Conclusion:** The results obtained allowed to identify early changes in this model of DM. A correlation was observed between contractility changes observed directly at the cellular level by measuring cell and sarcomere variation with changes in cardiac morphology and function as a result of DM.

Key-words: Bioengineering. Diabetes mellitus. Muscle cells. Echocardiography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ilustração da composição do pâncreas com os ácinos e as ilhotas de Langerhans. As ilhotas contêm três tipos principais de células, as células alfa, beta e delta 29
- Figura 2 – Fibra muscular representa uma célula individual. Cada uma dessas fibras é formada por diversas miofibrilas 33
- Figura 3 – Composição do filamento fino e sua interação com o disco Z. O filamento fino é formado pelas proteínas actina, nebulina, que age como um citoesqueleto do filamento, tropomiosina, e a troponina 33
- Figura 4 – Estrutura de um filamento grosso. Uma porção globular formada por cadeias leves e conhecida como ponte cruzada se projeta da cauda, formada por cadeias pesadas, em direção ao filamento fino 34
- Figura 5 – Diferenças de regiões ao longo do sarcômero. A - Imagem obtida de uma miofibrila evidenciando o padrão de desvio da luz polarizada de acordo com as diferentes regiões ao longo do sarcômero. B – Cada miofibrila é cercada pelo retículo sarcoplasmático e os túbulos T que auxiliam na condução do potencial de ação. C – Organização das proteínas no sarcômero que definem as diferentes bandas 35
- Figura 6 – Ciclo das pontes cruzadas. Estado a - estado relaxado em que ATP está parcialmente hidrolisado e não há nenhuma interação entre actina e miosina. Estado b - na presença de elevada concentração de Ca^{2+} intracelular, a miosina se liga à actina. Estado c - hidrólise do ATP é finalizada com liberação dos produtos (ADP e P_i). Ocorre uma mudança conformacional na ponte cruzada em direção ao centro do sarcômero. Estado d - ATP se liga à miosina diminuindo a interação entre actina e miosina, causando a separação entre os dois. O novo ATP é parcialmente hidrolisado e o ciclo recomeça 36
- Figura 7 – Variação do potencial de membrana ao longo do tempo que ocorre durante o potencial de ação de uma célula cardíaca do ventrículo 37
- Figura 8 – Região da célula cardíaca com a presença de um túbulo T. O cálcio que entra pelos canais presentes no sarcolema se liga aos receptores RyR do RS causando a liberação de Ca^{2+} desta estrutura, permitindo a contração. O gráfico menor mostra a sequência do potencial de ação (AP), aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_i$) e contração de um miócito . . . 37
- Figura 9 – Gráfico mostrando a porcentagem de atuação de cada mecanismo para retirada de Ca^{2+} intracelular. SR - captação pelo RS; NCX - trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; SL Ca-ATPase - transporte ativo de Ca^{2+} para o meio extracelular; Mito - bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ situada na mitocôndria 38

Figura 10 – Imagem do coração com as artérias coronárias. No método Langendorff, o coração é canulado pela aorta e a solução atinge as coronárias pelo óstios esquerdo e direito devido ao fechamento da válvula aórtica	40
Figura 11 – Resumo do procedimento para isolamento de miócitos cardíacos. A perfusão pode ser feita a uma pressão hidrostática constante, com a solução mantida a uma altura constante em relação ao coração canulado ou a uma taxa de fluxo constante, com auxílio de uma bomba. Para ambos os métodos, a solução é aquecida, a 37 °C, utilizando-se uma serpentina ligada a um circulador de água para aquecimento	40
Figura 12 – Desenho experimental com todas as medições realizadas no grupo controle e no grupo com animais diabéticos	47
Figura 13 – Ecocardiografia para obtenção de imagens no modo M. A. Janela paraesternal em que o transdutor foi posicionado para obtenção de imagens no plano eixo curto do coração. B. Planos do coração com destaque para o plano eixo curto em vermelho. C. Feixe do ultrassom para obtenção das imagens no plano eixo curto do coração ao nível dos músculos papilares . . .	49
Figura 14 – Imagem no modo M obtida a partir da imagem obtida no plano eixo curto do coração. Na parte superior, a linha amarela foi posicionada para investigar o campo do ultrassom, permitindo a análise do movimento do ventrículo ao longo do tempo, mostrado na parte inferior da figura	50
Figura 15 – Ecocardiografia com Doppler pulsado. A. Janela apical em que o transdutor foi posicionado para obtenção de imagens no plano apical do coração. B. Planos do coração com destaque para o plano apical em vermelho. C. Feixe do ultrassom para obtenção das imagens no plano apical do coração permitindo visualização das quatro câmaras	51
Figura 16 – Ecocardiografia com Doppler pulsado para análise do fluxo transmitral. A. Imagem do plano apical do coração em que é possível visualizar as quatro câmaras. O volume de amostragem, destacado em amarelo, foi posicionado na saída da válvula mitral. B. Registro de fluxo obtido na saída da válvula mitral a partir do Doppler pulsado	51
Figura 17 – Ecocardiografia com Doppler tecidual para análise do movimento do miocárdio. A. Imagem do plano apical do coração em que é possível visualizar as quatro câmaras. O volume de amostragem, destacado em amarelo, foi posicionado no anel mitral septal. B. Registro de velocidade do miocárdio obtido no anel mitral septal a partir do Doppler tecidual	52
Figura 18 – Eletrocardiograma para registro da atividade elétrica nos ratos. A. Descrição esquemática da medição do eletrocardiograma nos ratos. B. Registro típico do eletrocardiograma com os parâmetros avaliados na medição	53

Figura 19 – Sistema Langendorff para dissociação enzimática. A. Descrição esquemática do sistema Langendorff utilizado para dissociação enzimática do coração de ratos Wistar. B. Foto do sistema durante um experimento de dissociação	54
Figura 20 – Comparação entre dois instantes da perfusão com a solução contendo enzimas. A. Foto do coração no início da perfusão com a solução contendo enzimas. B. Foto ao fim da perfusão com a solução com enzimas, com o coração mais pálido se comparado com o início	55
Figura 21 – Imagens de miócitos cardíacos isolados obtidos por dissociação enzimática pelo método Langendorff. (A) aumento de 200x. (B) aumento de 400x	55
Figura 22 – Imagem do sistema utilizado para medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado com destaque para os componentes utilizados para visualização e captura das imagens das células	56
Figura 23 – Imagem da lâmina contendo a escala com graduação de 0,01 mm utilizada para calibração. A imagem apontada pela seta azul apresenta a escala com aumento de 4x	57
Figura 24 – Imagem obtida do <i>software</i> ImageJ utilizado para calibração espacial do <i>software</i> IonWizard. À esquerda, uma foto obtida com a lente objetiva de 40x foi utilizada, com a linha vermelha traçada para obtenção da distância entre os dois segmentos da escala. À direita, o resultado desta distância em <i>pixels</i>	57
Figura 25 – Imagens da câmara utilizada para estimulação elétrica dos miócitos cardíacos e controle da temperatura da solução com células. À esquerda, fotografia da câmara utilizada nos experimentos. À direita, detalhes da câmara com o local em que as células são colocadas	58
Figura 26 – Ilustração da montagem realizada para medição da temperatura utilizando o termistor e placa de PET revestida com ITO presente na câmara para os experimentos de medição da contratilidade	59
Figura 27 – Imagem do <i>software</i> IonWizard. A parte superior mostra o módulo correspondente à detecção de bordas com a imagem de vídeo gerada pela câmera acoplada ao microscópio e o gráfico de intensidade da imagem. A parte inferior, à esquerda, mostra o posicionamento das linhas na imagem de vídeo e a detecção de borda realizada pelo <i>software</i> . À direita, é possível ver os mesmos limites de detecção mais o limiar escolhido para detecção da borda	60
Figura 28 – Imagem do <i>software</i> IonWizard em três instantes de tempo durante a estimulação elétrica de um miócito cardíaco	61
Figura 29 – Imagem do <i>software</i> IonWizard mostrando o sinal de variação do comprimento do miócito cardíaco isolado durante a estimulação elétrica e o sinal obtido a partir da média de encurtamentos	61

Figura 30 – Imagem do <i>software</i> IonWizard com o sinal de variação média do comprimento do miócito cardíaco isolado. Cinco intervalos estão identificados no sinal e cada um destacado por uma cor: linha de base destacada em amarela; deflexão em vermelho; pico em azul; recuperação em verde; e retorno à linha de base em roxo	62
Figura 31 – Imagem do <i>software</i> IonWizard com o módulo para medição do comprimento do sarcômero. A parte superior da figura mostra a imagem de vídeo gerada pela câmera acoplada ao microscópio e a inferior os sinais derivados da imagem de vídeo utilizados para a medição do comprimento do sarcômero	64
Figura 32 – Imagem do <i>software</i> IonWizard em três instantes de tempo durante a estimulação elétrica de um miócito cardíaco, sendo possível visualizar o deslocamento do pico no espectro do sinal da FFT	65
Figura 33 – Imagem do <i>software</i> IonWizard mostrando o sinal de variação do comprimento do sarcômero durante a estimulação elétrica e o sinal obtido a partir da média de encurtamentos do sarcômero	65
Figura 34 – Processo de produção dos eletrodos por fusão do fio de prata. (A) Fusão do fio e formação da esfera. (B) É possível ver uma pequena esfera na ponta da pinça. (C) Acompanhamento da medida da esfera com um paquímetro durante sua fabricação	66
Figura 35 – À esquerda, estrutura de silicone fabricada para manter os eletrodos em contato com o epicárdio do coração. À direita, o esquema com a disposição dos eletrodos presos na estrutura e as distâncias representadas em mm . . .	67
Figura 36 – Sistema de aquisição com condicionadores de sinal universal utilizado para medição dos potenciais elétricos do coração	67
Figura 37 – Valores de glicemia dos ratos do grupo diabético (n=8 animais). * $P \leq 0,001$	71
Figura 38 – Comparação dos valores de glicemia entre os grupos controle e diabético 14 dias após indução. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados. * $P \leq 0,001$	71
Figura 39 – Comparação dos valores de massa entre os grupos controle e diabético 14 dias após indução. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados. * $P \leq 0,001$	72
Figura 40 – Gráficos dos parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do miócito que apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas	75
Figura 41 – Gráficos dos parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do sarcômero que apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas	76

Figura 42 – Imagem com os sinais obtidos com os eletrodos epicárdicos no coração de rato. À esquerda, os sinais captados nos 6 diferentes eletrodos. À direita, a disposição dos eletrodos, com a localização de cada um deles	77
Figura 43 – Exemplo mostrando o resultado da aplicação do filtro sobre o eletrograma. À esquerda é possível observar o sinal original, em azul, junto com o sinal filtrado, em vermelho. À direita da figura é possível observar o sinal (em vermelho) com linha de base corrigida resultado da subtração do sinal original com o sinal filtrado	77
Figura 44 – Gráfico com o eletrograma original de um eletrodo (em azul) e o respectivo sinal da derivada (em vermelho)	78
Figura 45 – Exemplo do resultado da identificação do instante em que a derivada é mínima (marcado em vermelho no gráfico) no eletrograma	78
Figura 46 – Comparação entre dois sinais de encurtamento obtidos do grupo controle e diabético	81
Figura 47 – Mecanismos propostos para a disfunção diastólica e sistólica no VE que ocorre devido a DM	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das concentrações intracelular e extracelular de células musculares cardíacas	38
Tabela 2 – Valores obtidos durante o processo de calibração do <i>software</i> IonWizard para cada lente objetiva do microscópio	57
Tabela 3 – Características do transiente do sinal de contração analisado pelo <i>software</i> Ionwizard	63
Tabela 4 – Valores de ganho calculados para cada canal do sistema de aquisição com os condicionadores de sinal universal	68
Tabela 5 – Parâmetros ecocardiográficos antes da normalização e após a normalização pela massa corpórea obtidos a partir da análise pelo modo M. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados	73
Tabela 6 – Parâmetros ecocardiográficos calculados a partir da análise pelo modo M. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados	73
Tabela 7 – Parâmetros ecocardiográficos obtidos pelo Doppler pulsado no fluxo transmitral e pelo Doppler pulsado tecidual. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados	74
Tabela 8 – Parâmetros obtidos a partir da análise do eletrocardiograma. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados	74
Tabela 9 – Parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do miócito que permaneceram inalterados nos grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas	74
Tabela 10 – Parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do sarcômero que permaneceram inalterados nos grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas	75
Tabela 11 – Valores de frequência cardíaca obtida durante a perfusão com o sistema Langendorff. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Velocidade diastólica tardia
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Cardiomiopatia diabética
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DIVE	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
DM	Diabetes mellitus
E	Velocidade diastólica precoce
ECG	Eletrocardiograma
ERPP	Espessura relativa da parede posterior
FE	Fração de ejeção
FEn	Fração de encurtamento
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	Instituto do Coração
ITO	<i>Indium tin Oxide</i>
MEMS	<i>Microeletromechanical system</i>
NCX	Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
PET	Polietileno tereftalato
PLL	<i>Phase-Locked Loop</i>
PPVE	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo
RCS	Espécies reativas de carbonila
ROI	Região de interesse

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	<i>Ryanodine receptor</i>
S'	Velocidade sistólica do miocárdio
SERCA	ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
SIV	Espessura do septo interventricular
STZ	Estreptozotocina
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	27
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
1.1	Diabetes mellitus	29
1.1.1	Anatomia fisiológica do pâncreas	29
1.1.2	Fisiopatologia da diabetes	30
1.1.3	Modelos experimentais de DM	30
1.2	Cardiomiopatia diabética	31
1.2.1	Métodos de diagnóstico da CD	31
1.2.1.1	<i>Ecocardiografia</i>	31
1.2.1.2	<i>Eletrocardiograma</i>	32
1.3	Estrutura das células musculares cardíacas	32
1.4	Controle da contração das células musculares cardíacas	34
1.4.1	Ciclo das pontes cruzadas	34
1.4.2	Acoplamento excitação-contração	36
1.4.3	Relaxamento do músculo cardíaco	37
1.5	Metodologias para estudo do miócito cardíaco isolado	38
1.5.1	Técnicas de dissociação	39
1.5.1.1	<i>Dissociação mecânica</i>	39
1.5.1.2	<i>Dissociação enzimática</i>	39
1.5.2	Estimulação do miócito cardíaco isolado	41
1.5.2.1	<i>Estimulação química</i>	42
1.5.2.2	<i>Estimulação elétrica</i>	42
1.5.3	Métodos para medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado	42
1.5.3.1	<i>Métodos para medição da força de contração</i>	42
1.5.3.2	<i>Métodos para avaliação da contratilidade a partir da dinâmica de encurtamento</i>	43
2	HIPÓTESE E OBJETIVO	45
3	METODOLOGIA	47
3.1	Desenho experimental	47
3.2	Animais	47
3.3	Indução da diabetes	48
3.4	Ecocardiografia	48
3.5	Obtenção do eletrocardiograma	52
3.6	Dissociação enzimática para obtenção de miócitos cardíacos isolados	53
3.7	Medição da contratilidade de miócitos cardíacos isolados	55

3.7.1	Visualização das células e captura das imagens	56
3.7.2	Calibração do <i>software</i> IonWizard	56
3.7.3	Estimulação elétrica dos miócitos cardíacos isolados	58
3.7.4	Controle da temperatura na câmara de estimulação	58
3.7.5	Medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado	59
3.7.6	Medição da variação do comprimento do sarcômero	62
3.8	Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos	66
3.8.1	Fabricação dos eletrodos	66
3.8.2	Fabricação da estrutura para os eletrodos	66
3.8.3	Sistema de aquisição	67
3.8.4	Algoritmo para filtragem e análise dos eletrogramas	68
3.9	Análise dos dados	68
4	RESULTADOS	71
4.1	Indução da diabetes	71
4.2	Ecocardiografia	72
4.3	Obtenção do eletrocardiograma	72
4.4	Medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado	72
4.4.1	Medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado	72
4.4.2	Medição da variação do comprimento do sarcômero	73
4.5	Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos	76
5	DISCUSSÃO	79
5.1	Indução da diabetes	79
5.2	Ecocardiografia	79
5.3	Obtenção do eletrocardiograma	80
5.4	Medição da contratilidade de miócitos cardíacos isolados	80
5.5	Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos	83
6	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A – PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS	95
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	97

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) está entre as 10 principais causas de morte global e é considerada um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que 425 milhões de pessoas possuem DM. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking de países com o maior número de pessoas com DM (12,5 milhões de pessoas) e a previsão para o ano de 2045 é que este número atinja 20 milhões de pessoas (1).

Quando não bem tratada, a diabetes pode afetar diversos órgãos e sistemas. A DM é uma das principais causas de doença cardiovascular aumentando entre duas a três vezes a probabilidades de doenças cardiovasculares (2). Além disso, existem evidências de que pacientes com DM sofrem de uma forma de doença miocárdica não relacionada a qualquer outra doença cardiovascular, denominada cardiomiopatia diabética (CD) (3). A fisiopatologia da CD, apesar de amplamente estudada, ainda não é totalmente conhecida. Modelos experimentais da diabetes podem ser utilizados para o melhor entendimento dessa patologia e identificação de tratamentos que permitam prevenir sua progressão.

Um dos modelos mais utilizados é a indução pela estreptozotocina (STZ). Nestes modelos é possível avaliar, *in vivo*, as mudanças estruturais e funcionais que ocorrem no coração em decorrência da CD, através do ecocardiograma e do eletrocardiograma. Complementarmente, os estudos em miócitos cardíacos isolados possibilitam investigar as propriedades eletrofisiológicas e mecânicas destas células.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, são apresentados os principais conceitos relacionados à DM e seus efeitos no coração. São também apresentadas as estruturas e as bases conceituais da contração do músculo cardíaco além dos métodos existentes para obtenção e estimulação do miócito cardíaco isolado e medição da contratilidade.

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Anatomia fisiológica do pâncreas

O pâncreas é constituído por dois tipos principais de tecidos, os ácinos, que secretam sucos digestivos no duodeno e as ilhotas de Langerhans, que secretam insulina e glucagon diretamente no sangue. As ilhotas contêm três tipos principais de células, as células alfa, beta e delta, sendo que as primeiras correspondem a cerca de 25 % do total de todas as células das ilhotas e são responsáveis por secretar glucagon. As células beta constituem cerca de 60 % de todas as células e secretam insulina. As células delta, por sua vez, compreendem cerca de 10 % do total e secretam somatostatina (4). A figura 1 apresenta uma ilustração do pâncreas com os dois principais tipos de tecidos e as células que compõem as ilhotas de Langerhans.

Figura 1 – Ilustração da composição do pâncreas com os ácinos e as ilhotas de Langerhans. As ilhotas contêm três tipos principais de células, as células alfa, beta e delta

Fonte: Modificado de (4)

Tanto a insulina quanto o glucagon são hormônios que atuam para manter a glicemia em nível normal. A insulina facilita o transporte da glicose através da membrana nas células musculares e nas células hepáticas com a maior parte dessa glicose sendo armazenada sob a forma de glicogênio. O glucagon apresenta um efeito inverso ao da insulina, promovendo o aumento do nível de glicemia com a quebra do glicogênio (glicogenólise) ou aumento na produção de glicose (gliconeogênese).

A manutenção do nível de glicemia é importante não só pela glicose ser uma fonte energética como também por exercer pressão osmótica no líquido extracelular. A glicose, em níveis excessivos, pode resultar em desidratação celular e causar perdas pela urina. Esta perda provoca diurese osmótica pelos rins, podendo causar depleção dos líquidos e eletrólitos corporais (5).

1.1.2 Fisiopatologia da diabetes

A DM é uma condição crônica em que os níveis de insulina ou a capacidade de resposta dos tecidos à insulina (ou ambos) é insuficiente para manter níveis normais de glicemia (6). Os dois principais tipos de diabetes são a DM tipo 1 e tipo 2. No primeiro tipo, na maioria dos casos, a doença é autoimune e resulta na destruição das células beta do pâncreas levando à baixa ou não produção de insulina. Inúmeros fatores genéticos e ambientais contribuem para a ativação imunológica que desencadeia o processo destrutivo das células beta (7).

A DM tipo 2 está associada à resistência celular à ação da insulina ou mesmo deficiência nas células beta em secretar uma quantidade suficiente de insulina (8). A doença é desencadeada, na maioria das vezes, pela obesidade associada à predisposição genética. Os casos estão ligados ao estilo de vida, como alimentação inadequada, sobrepeso, sedentarismo, etilismo, tabagismo e ao histórico familiar (9).

1.1.3 Modelos experimentais de DM

Os modelos experimentais de DM envolvem o uso de animais e podem ser divididos em dois grupos: modelos genéticos e modelos induzidos quimicamente (10). Para o primeiro, os animais desenvolvem espontaneamente a DM por uma predisposição genética. Neste modelo é possível ter animais com DM tipo 1, a destacar os ratos BB (*Biobreading*) (11) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) (12) e animais com DM tipo 2, como os ratos ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*) (13) e Goto-Kakizaki (14). Nos modelos induzidos quimicamente, há uma destruição química seletiva das células beta pancreáticas impedindo a produção de insulina. As substâncias usadas para esta indução em animais são a STZ e a aloxana.

A STZ é um composto natural produzido pela bactéria do solo *streptomyces acromogenes*, que pode ser utilizado no tratamento quimioterapêutico de tumores do pâncreas (15). A STZ é citotóxica para células beta pancreáticas e atua como um inibidor de síntese de DNA impedindo a biossíntese e a secreção de insulina. A toxicidade seletiva da STZ com as células beta do pâncreas está relacionada ao fato da STZ possuir uma estrutura química análoga a da glicose, permitindo a sua entrada nas células beta através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) na membrana plasmática, e ao fato das células do pâncreas serem mais ativas do que outras células na ingestão de glicose. Células que também expressam o transportador GLUT2, como os hepatócitos e células tubulares renais também são suscetíveis ao efeito da STZ (16).

A aloxana, assim como a STZ, possui uma estrutura química análoga à da glicose acumulando-se nas células beta pelo transportador GLUT2. A diferença é que, neste caso, a morte das células beta é devida a danos aos vasos sanguíneos das ilhotas pancreáticas (17).

1.2 **Cardiomiopatia diabética**

A CD refere-se a uma doença que afeta o miocárdio em pacientes com DM causando uma ampla variedade de anormalidades estruturais e funcionais podendo resultar em uma hipertrofia do ventrículo esquerdo, disfunção diastólica e sistólica ou uma combinação destes (18). O conceito da CD é que estas anormalidades estruturais e funcionais são decorrentes da mudança a nível celular que ocorre devido à DM e não a outras doenças que também podem afetar o coração, como doença arterial coronariana, hipertensão ou doença cardíaca valvular (3).

Acredita-se que a CD seja decorrente de diversos fatores e algumas hipóteses propostas como causa da CD incluem a disfunção autonômica, distúrbios metabólicos, anormalidades na homeostase iônica, alteração em proteínas estruturais, hiperglicemia e fibrose intersticial (19) (20). A anormalidade na homeostase iônica, principalmente a relacionada com o íon Ca^{2+} , é um dos mecanismos responsáveis pela diminuição da contratilidade do miocárdio (20). Na DM, há redução de ATPases (21) (enzimas que catalisam a decomposição da adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e íon fosfato) como a ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), redução da retirada de Ca^{2+} intracelular pelo retículo sarcoplasmático (RS) (22) (23) e redução de outros trocadores que também atuam na diminuição da concentração de Ca^{2+} citosólico, como trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (24) e o transporte ativo através do sarcolema (25).

1.2.1 Métodos de diagnóstico da CD

Dentre os diversos métodos para avaliação da CD é possível citar dois possíveis: ecocardiograma e eletrocardiograma.

1.2.1.1 *Ecocardiografia*

A ecocardiografia é uma ferramenta de diagnóstico não invasiva e relativamente barata para detectar anormalidades cardíacas estruturais e funcionais decorrentes de condições como a CD. No caso do ecocardiograma Doppler, cujo princípio de funcionamento é baseado na mudança na frequência de sinais de ultrassom refletidos a partir de objetos em movimento, é possível avaliar a velocidade do fluxo sanguíneo. Valores como tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) podem ser avaliados por esta técnica. Este parâmetro analisa basicamente a fase de relaxamento do miocárdio, que ocorre após o pico sistólico, no período entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral, no qual o ventrículo esquerdo não altera

seu volume. Alguns estudos relatam um aumento no TRIV em decorrência da DM (26) (27) (28).

O Doppler tecidual pode ser utilizado para avaliar disfunção diastólica (29) e sistólica (18) que ocorre em decorrência da DM. Esta técnica apresenta o mesmo princípio de funcionamento do ecocardiograma Doppler e permite avaliar as velocidades associadas com a movimentação das paredes do miocárdio durante a sístole e diástole (30) (31) e a velocidade no anel mitral (32) (33). A velocidade de movimento do anel reflete o encurtamento e alongamento das fibras miocárdicas ao longo de um plano longitudinal (31). Os parâmetros mais comuns na análise do Doppler tecidual são: velocidade sistólica do miocárdio medida na região do anel mitral que reflete o encurtamento sistólico miocárdico longitudinal (S') (31); velocidade diastólica precoce do anel mitral (E'); e velocidade diastólica tardia do anel mitral (A').

1.2.1.2 Eletrocardiograma

O eletrocardiograma (ECG) é o registro da atividade elétrica do coração. Como consequência da CD, distúrbios no ECG foram relatados, como aumento do intervalo QRS e do intervalo QT (34) e diminuição na frequência cardíaca e na variabilidade da frequência cardíaca (35). Esta última reflete a atividade dos componentes simpático e vagal permitindo a avaliação da função autonômica (36).

1.3 Estrutura das células musculares cardíacas

O coração é composto de músculos classificados como músculos estriados. Essa denominação é resultado de estrias transversais que surgem quando vistas ao microscópio, devido à combinação organizada das moléculas de proteínas presentes no interior das células. Uma propriedade importante do músculo estriado é sua contratilidade que contribui para a gênese de força e encurtamento das células deste tipo de músculo. Ao contrário do músculo esquelético, o cardíaco apresenta ação involuntária, ou seja, é modulado pelo sistema nervoso autônomo.

O músculo cardíaco é composto por inúmeras células musculares, também conhecidas como miócitos cardíacos ou fibras. Estas fibras estão interligadas nas extremidades, sendo separadas umas das outras por discos intercalados. Cada fibra contém um feixe de filamentos que se espalha ao longo do eixo axial da célula, chamado de miofibrilas, como é possível ver na figura 2. As miofibrilas, por sua vez, são formadas por estruturas repetitivas que correspondem à unidade básica contrátil, o sarcômero. Cada sarcômero é delimitado por duas linhas, chamadas de linhas Z. Entre essas linhas há um arranjo de dois conjuntos de filamentos, os finos e grossos. Os filamentos finos apresentam em sua composição as seguintes proteínas: actina, nebulina, que age como um citoesqueleto do filamento, tropomiosina e a troponina, formada por suas três subunidades (troponina T, troponina I e troponina C) com a função de regular a interação entre os filamentos finos e grossos (figura 3). Os filamentos grossos, por sua vez,

são formados principalmente pela proteína miosina, contando também com outras proteínas como a titina, que compõe o citoesqueleto do filamento. A miosina é formada por 6 diferentes polipeptídeos, sendo dois pares de cadeia pesada e um par de cadeia leve. As cadeias pesadas são enroladas formando uma cauda sendo que na extremidade de cada cadeia pesada há uma estrutura globular que se projeta em direção aos filamentos finos. Estas estruturas globulares são formadas de cadeias leves e recebem o nome de pontes cruzadas (figura 4) (6).

Figura 2 – Fibra muscular representa uma célula individual. Cada uma dessas fibras é formada por diversas miofibrilas

Fonte: Modificado de (6)

Figura 3 – Composição do filamento fino e sua interação com o disco Z. O filamento fino é formado pelas proteínas actina, nebulina, que age como um citoesqueleto do filamento, tropomiosina, e a troponina

Fonte: Modificado de (6)

No sarcômero, além das linhas Z, é possível distinguir outras regiões de acordo com a disposição dos filamentos. Ao lado da linha Z há uma região conhecida como banda I que é caracterizada por ser uma região isotrópica que não desvia a luz polarizada sendo composta

Figura 4 – Estrutura de um filamento grosso. Uma porção globular formada por cadeias leves e conhecida como ponte cruzada se projeta da cauda, formada por cadeias pesadas, em direção ao filamento fino

Fonte: Modificado de (6)

de filamentos finos. Entre duas bandas I há uma região conhecida como banda A, que desvia a luz polarizada por ser uma região anisotrópica e é formada pela sobreposição de filamentos finos e grossos. No centro do sarcômero e na região da banda A há a banda H, que representa a porção em que não há mais sobreposição dos filamentos, restando apenas os filamentos grossos. Na figura 5 é possível distinguir estas bandas ao longo do sarcômero nas três imagens apresentadas.

As miofibrilas estão envolvidas pelo retículo sarcoplasmático (RS) sendo que esta estrutura atua na regulação de Ca^{2+} intracelular. Receptores como a rianodina (RyR) estão presentes no retículo e apresentam um importante papel na liberação do Ca^{2+} . Além disso, a célula muscular cardíaca apresenta invaginações no sarcolema nas regiões das linhas Z, conhecidas como túbulos transversos ou túbulos T. Estes túbulos auxiliam na condução do potencial de ação para o interior das miofibrilas.

1.4 Controle da contração das células musculares cardíacas

1.4.1 Ciclo das pontes cruzadas

A ponte cruzada da miosina apresenta uma grande afinidade com a actina. Além disso, a ponte possui a capacidade de catalisar a hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) gerando como produtos o difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico (Pi). Esta interação entre actina e miosina, associada com a hidrólise de ATP, representa o processo fundamental quimiomecânico no qual a energia química é convertida em energia mecânica pela célula muscular intacta (37).

Todo este processo de interação entre os filamentos e hidrólise do ATP ocorre através do ciclo da ponte cruzada. No estado de repouso a ligação entre actina e miosina não ocorre devido ao fato de os sítios de ligação na actina não estarem expostos para interação com a miosina. Além disso, neste estado a miosina possui ATP parcialmente hidrolisado (estado a -

Figura 5 – Diferenças de regiões ao longo do sarcômero. A - Imagem obtida de uma miofibrila evidenciando o padrão de desvio da luz polarizada de acordo com as diferentes regiões ao longo do sarcômero. B – Cada miofibrila é cercada pelo retículo sarcoplasmático e os túbulos T que auxiliam na condução do potencial de ação. C – Organização das proteínas no sarcômero que definem as diferentes bandas

Fonte: Modificado de (6) e (4)

figura 6). Quando Ca^{2+} é liberado pelo RS, ele se liga à troponina-C, sendo que o movimento do complexo troponina induz uma mudança conformacional na tropomiosina, expondo os sítios de ligação na actina (38). Isto permite que a miosina, energizada pela hidrólise do ATP, se ligue à actina (estado b - figura 6). Com a miosina ligada, há também uma mudança conformacional, porém na ponte cruzada, o que faz com que o filamento fino se mova em direção ao centro do sarcômero (estado c - figura 6). Esta mudança na conformação utiliza parte da energia livre disponível da hidrólise do ATP, minimizando a energia livre. Durante a transição do estado b para o c há liberação do ADP e Pi da cabeça da miosina. Esta liberação permite que uma molécula de ATP se ligue à miosina, o que faz com que a afinidade entre actina e miosina diminua, cessando a ligação (estado d - figura 6). Na miosina ocorre a hidrólise do ATP causando aumento da energia livre e possibilitando a restituição da posição da ponte cruzada, voltando ao estado inicial do ciclo.

Figura 6 – Ciclo das pontes cruzadas. Estado a - estado relaxado em que ATP está parcialmente hidrolisado e não há nenhuma interação entre actina e miosina. Estado b - na presença de elevada concentração de Ca^{2+} intracelular, a miosina se liga à actina. Estado c - hidrólise do ATP é finalizada com liberação dos produtos (ADP e P_i). Ocorre uma mudança conformacional na ponte cruzada em direção ao centro do sarcômero. Estado d - ATP se liga à miosina diminuindo a interação entre actina e miosina, causando a separação entre os dois. O novo ATP é parcialmente hidrolisado e o ciclo recomeça

Fonte: Modificado de (6)

1.4.2 Acoplamento excitação-contração

A excitação do músculo cardíaco começa quando um potencial de ação propaga-se ao longo do sarcolema das células, espalhando-se para o seu interior através dos túbulos T. Este potencial de ação, diferentemente do encontrado no músculo esquelético, apresenta uma despolarização por um intervalo de tempo maior, caracterizado por um platô típico no potencial, como ilustra a figura 7. A causa desse platô se deve a uma entrada lenta de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de diferença de potencial do tipo L presentes no sarcolema.

O aumento da concentração de cálcio intracelular devido à abertura dos canais de cálcio no sarcolema é, entretanto, insuficiente para o processo da contração. No entanto, esta pequena quantidade de cálcio atua como um gatilho para liberação de Ca^{2+} do RS. Na região dos túbulos T, o RS se encontra muito próximo do sarcolema. Por isso, o cálcio que atua como gatilho se liga a receptores RyR que se encontram no RS e são responsáveis pela liberação do Ca^{2+} desta estrutura. A figura 8 mostra a região do túbulo T com um RS próximo ao sarcolema e os canais e receptores envolvidos. A tabela 1 apresenta as concentrações extracelulares e

intracelulares dos íons que atuam no processo de excitação-contração (6).

Figura 7 – Variação do potencial de membrana ao longo do tempo que ocorre durante o potencial de ação de uma célula cardíaca do ventrículo

Fonte: Modificado de (39)

Figura 8 – Região da célula cardíaca com a presença de um túbulo T. O cálcio que entra pelos canais presentes no sarcolema se liga aos receptores RyR do RS causando a liberação de Ca^{2+} desta estrutura, permitindo a contração. O gráfico menor mostra a sequência do potencial de ação (AP), aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}]_i$) e contração de um miócito

Fonte: Modificado de (40)

1.4.3 Relaxamento do músculo cardíaco

O relaxamento do músculo cardíaco ocorre com a retirada do Ca^{2+} intracelular, seja ele liberado pelo RS ou introduzido pelos canais de cálcio tipo L do sarcolema. O principal mecanismo que atua neste sentido é a captação de Ca^{2+} pelo RS por meio de uma bomba

Tabela 1 – Valores das concentrações intracelular e extracelular de células musculares cardíacas

Íon	Conc. Extracelular [mM]	Conc. Intracelular [mM]
Na ⁺	145	10
K ⁺	4	135
Ca ²⁺	2	0,1

Fonte: (4)

de Ca²⁺ (Ca²⁺ - ATPase) permitindo que o retículo tenha cálcio para uma futura contração. O Ca²⁺ intracelular, na contração, não provém apenas do retículo, mas também do meio extracelular. Por isso outros mecanismos são necessários para retirada do cálcio intracelular, sendo eles: trocador Na⁺/Ca²⁺ que funciona com uma estequiometria de 3Na:1Ca, transporte ativo de Ca²⁺ para o meio extracelular através do sarcolema e bomba Na⁺/Ca²⁺ situada na mitocôndria, sendo que este último mecanismo não atua tanto quanto os outros. A figura 9 mostra os principais mecanismos de remoção de Ca²⁺ e suas respectivas contribuições, sendo SR a remoção promovida pelo RS, NCX a troca Na⁺/Ca²⁺ e SL Ca-ATPase e Mito o transporte ativo para o meio extracelular e a bomba Na⁺/Ca²⁺ situada na mitocôndria, respectivamente.

Figura 9 – Gráfico mostrando a porcentagem de atuação de cada mecanismo para retirada de Ca²⁺ intracelular. SR - captação pelo RS; NCX - trocador Na⁺/Ca²⁺; SL Ca-ATPase - transporte ativo de Ca²⁺ para o meio extracelular; Mito - bomba Na⁺/Ca²⁺ situada na mitocôndria

Fonte: Modificado de (6)

1.5 Metodologias para estudo do miócito cardíaco isolado

Os miócitos cardíacos isolados permitem o estudo das características da contração muscular sem as influências dos tecidos conjuntivos e do endotélio eliminando também a

heterogeneidade de preparações multicelulares (41). Uma etapa crucial do estudo envolvendo miócitos cardíacos isolados é a obtenção do mesmo. A seguir, são descritos os métodos existentes para estudo dos miócitos isolados juntamente com as técnicas existentes para dissociação do tecido cardíaco e obtenção de células isoladas estimuláveis.

1.5.1 Técnicas de dissociação

Duas técnicas podem ser empregadas para obtenção do miócito cardíaco isolado: dissociação mecânica ou dissociação enzimática.

1.5.1.1 Dissociação mecânica

A dissociação mecânica promove uma ruptura forçada da matriz extracelular e a consequente liberação das células. Este método é mais barato e rápido do que a dissociação enzimática porém, devido ao estresse mecânico provocado, há uma dificuldade maior na manutenção da membrana celular, o que pode comprometer estudos eletrofisiológicos. Em geral, células obtidas por este método passam por um processo de permeabilização da membrana, feita através do tratamento com um detergente. Com a célula mais permeável é possível melhorar a visualização dos sarcômeros (42) e estimular quimicamente o miócito, variando a concentração de Ca^{2+} extracelular.

Células obtidas pela dissociação mecânica são, em geral, adequadas para medição de força de contração já que neste tipo de medição a variação de Ca^{2+} extracelular é suficiente para estimular o miócito.

1.5.1.2 Dissociação enzimática

A dissociação enzimática se aproveita da ação de enzimas que digerem a matriz extracelular que une os miócitos, fornecendo células intactas e estimuláveis eletricamente. Este tipo de dissociação pode ser feito de duas maneiras distintas: o método Langendorff e dissociação de fragmentos do tecido do coração.

O primeiro método se baseia na perfusão retrógrada de solução contendo as enzimas. Basicamente, o coração é retirado e, com a canulação da aorta, inicia-se a perfusão da solução na direção contrária à direção natural do fluxo de sangue. Com este fluxo retrógrado há o fechamento da válvula aórtica, impedindo que a solução entre no ventrículo esquerdo. Consequentemente, a solução chega às artérias coronárias através dos orifícios na raiz da aorta, os óstios esquerdo e direito (figura 10) e, após passar pela circulação coronária, a solução chega ao átrio direito, via seio coronário, e deixa o coração pela abertura livre no átrio (43).

A perfusão da solução com as enzimas pode ser feita a uma pressão hidrostática constante ou a uma taxa de fluxo constante. Ambos os métodos foram empregados com sucesso na obtenção de miócitos cardíacos isolados (45). Além disso, na maioria dos procedimentos en-

Figura 10 – Imagem do coração com as artérias coronárias. No método Langendorff, o coração é canulado pela aorta e a solução atinge as coronárias pelo óstios esquerdo e direito devido ao fechamento da válvula aórtica

Fonte: Modificado de (44)

volvendo a dissociação por Langendorff, a temperatura da solução a ser perfundida é mantida a 37 °C (46). A figura 11 ilustra o procedimento necessário para a realização da dissociação pelo método de Langendorff a pressão constante e fluxo constante.

Figura 11 – Resumo do procedimento para isolamento de miócitos cardíacos. A perfusão pode ser feita a uma pressão hidrostática constante, com a solução mantida a uma altura constante em relação ao coração canulado ou a uma taxa de fluxo constante, com auxílio de uma bomba. Para ambos os métodos, a solução é aquecida, a 37 °C, utilizando-se uma serpentina ligada a um circulador de água para aquecimento

Fonte: Modificado de (45)

Na maioria dos protocolos para dissociação a perfusão se inicia com uma solução

com concentração de Ca^{2+} baixa ou nula para romper as conexões nos discos intercalados (47), seguida da perfusão de solução com enzimas para digestão da matriz extracelular. As enzimas são dissolvidas em solução contendo uma baixa concentração de Ca^{2+} , sendo que isto é necessário não só para uma adequada atividade da enzima, como também para evitar o fenômeno conhecido como paradoxo do Ca^{2+} . Este fenômeno ocorre quando, após o coração ser exposto a uma solução livre de Ca^{2+} , há uma deterioração quando a concentração de cálcio é restabelecida a valores fisiológicos, levando a alterações da estrutura miocárdica, como rompimento da membrana, hipercontratura das fibras e danos na mitocôndria (48). Diversas teorias tentam explicar este fenômeno, mas o consenso entre elas é que a depleção de cálcio e seu subsequente restabelecimento leva a um grande influxo de Ca^{2+} , sobrecarregando a célula (49).

Para evitar os efeitos do paradoxo é necessário realizar uma acomodação ao cálcio, expondo o tecido a baixas concentrações deste íon antes do restabelecimento a valores fisiológicos. Por isso, durante a dissociação é recomendável a presença do íon cálcio. Após a perfusão da solução com as enzimas e com o coração já flácido e pálido, o tecido é submetido a trituração para obtenção do miócito isolado. Em geral, a trituração é feita cortando-se o tecido em pequenos fragmentos e utilizando uma pipeta com abertura larga, de modo a minimizar o estresse mecânico nas células. Com os miócitos dissociados, a concentração de Ca^{2+} é aumentada gradativamente até atingir valores fisiológicos.

O segundo método de dissociação enzimática é mais simples e nasceu da necessidade de se estender os estudos com miócitos isolados para amostras humanas, já que, em geral, para este tipo de tecido a dissociação é feita a partir de fragmentos do miocárdio. Por isso, ao invés de se realizar a perfusão da solução com enzimas, a amostra do tecido cardíaco é dividida em pequenos fragmentos e incubada em uma solução contendo as enzimas. O rendimento deste método é menor se comparado com o de perfusão retrógrada já que, neste último, a penetração da solução através da circulação coronária favorece uma melhor digestão. Cuidados com o paradoxo do cálcio também devem ser tomados neste método, ou seja, os fragmentos devem ser incubados em uma solução com as enzimas contendo uma baixa concentração de Ca^{2+} e, após a dissociação, os miócitos isolados devem ser submetidos à acomodação do cálcio, com a concentração sendo aumentada gradualmente até chegar a valores fisiológicos. Células obtidas tanto pelo método de perfusão quanto pelo método de incubação dos fragmentos do tecido não apresentam nenhuma diferença que possa afetar os experimentos (50).

1.5.2 Estimulação do miócito cardíaco isolado

Miócitos cardíacos isolados podem ser estimulados de duas maneiras distintas: estimulação química ou elétrica, detalhadas a seguir.

1.5.2.1 Estimulação química

A estimulação química é feita variando-se a concentração de Ca^{2+} extracelular. Para que a célula se contraia é necessário permeabilizar a célula, criando uma ligação entre o meio intracelular e extracelular e permitindo que o Ca^{2+} entre e inicie o processo da contração. Isto é feito utilizando detergentes que possuem a capacidade de eliminar camadas da membrana celular promovendo a permeabilização celular.

1.5.2.2 Estimulação elétrica

A estimulação elétrica é feita pela aplicação de um campo elétrico criado pela corrente elétrica que flui através da solução que banha as células. O efeito da aplicação do campo elétrico externo é o de produzir uma variação espacial do potencial em volta da membrana celular. O meio intracelular é condutor, portanto cargas intracelulares se rearranjam de modo a manter o potencial intracelular virtualmente constante. Então a diferença de potencial transmembrana, dada pela diferença do potencial interno pelo externo, irá variar conforme as mudanças do potencial externo na superfície da célula. O movimento das cargas elétricas faz com que a célula se despolarize em um extremo e se hiperpolarize no outro (51). Esta despolarização local se propaga ao longo da célula, resultando no início do processo de contração.

1.5.3 Métodos para medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado

Os métodos para medição da contratilidade podem ser divididos em dois grandes grupos: os métodos que medem a força de contração de um miócito cardíaco isolado e os métodos que avaliam a contratilidade a partir da medição da dinâmica de encurtamento envolvida no processo de contração.

1.5.3.1 Métodos para medição da força de contração

Diversos métodos podem ser utilizados para medição da força de contração. Um dos métodos mais clássicos utiliza transdutores de força fixados a uma das extremidades da célula, enquanto que a outra extremidade se mantém fixa, presa a uma estrutura. Nesta condição mede-se a força de contração isométrica, já que o comprimento da célula é mantido constante. Na literatura é possível encontrar diversas medições de força de contração isométrica em miócitos cardíacos isolados com sistemas baseados neste princípio de medição. As diferenças principais entre os sistemas são quanto ao transdutor utilizado, podendo ser capacitivo (52)(53)(54) do tipo *strain-gauge* (55)(56) ou ainda transdutores especialmente desenvolvidos (57). Varia-se também o aparato para prender as células, sendo possível encontrar finas agulhas de aço inoxidável (55), micropipetas (54)(58) ou fibras de carbono (41)(59)(60), sendo que este último não exige a utilização de cola para fixação.

Outro método para medição da força de contração é utilizando a tecnologia de sistemas

microeletromecânicos (MEMS) para desenvolvimento de transdutores de força. Os MEMS utilizam materiais e técnicas de fabricação derivados da tecnologia de circuitos integrados para criar máquinas em micro-escala compostas de componentes mecânicos além da eletrônica tradicional. Com dispositivos miniaturizados é possível submergi-los diretamente na solução com a célula a ser analisada.

É possível também a utilização de micropostes elásticos. Um substrato contendo diversos desses micropostes é fabricado e os miócitos são posicionados sobre este substrato. Durante a contração das células há uma deflexão no microposte flexível, indicando um deslocamento do miócito. A medição da deflexão dos micropostes é feita por processamento sobre as imagens obtidas por uma câmera ligada a um microscópio e com essas medidas é possível estimar a força de contração do miócito isolado (61) (62).

1.5.3.2 Métodos para avaliação da contratilidade a partir da dinâmica de encurtamento

Os métodos envolvidos nesta avaliação podem ser divididos em duas categorias gerais: métodos que implementam técnicas de difração da luz e os que monitoram as imagens das células obtidas por um microscópio. Os métodos que empregam difração da luz são utilizados desde o século 19 e se baseiam nos padrões de difração que surgem da interferência da luz polarizada com as bandas A e I do sarcômero, sendo que na primeira banda a luz desvia enquanto que na segunda não. Com este método é possível monitorar a dinâmica do sarcômero se técnicas de detecção forem bem empregadas (63). Atualmente métodos deste tipo são pouco utilizados.

A segunda categoria, envolvendo imagens das células obtidas por microscópio, utiliza técnicas para quantificar a variação no comprimento da célula que ocorre durante a contração. Algumas delas se baseiam na detecção de padrões das estrias do sarcômero para tal tarefa, utilizando sistemas como *Phase-Locked Loop* em conjunto com fotodiodos (64) ou processamento sobre as imagens obtidas com o microscópio (65) e aplicação da transformada rápida de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*) devido a periodicidade do padrão de estrias do miócito (66). Outras técnicas fazem uso da detecção das extremidades da célula para medir o encurtamento causado pela contração. Para tanto, é possível utilizar fotodiodos posicionados com auxílio do microscópio nas extremidades da célula, atuando como um detector de bordas (67) ou um sistema de vídeo detectando variações na intensidade da luz captadas pelo elemento sensor da câmera, identificando assim as bordas de cada extremidade da célula (68).

2 HIPÓTESE E OBJETIVO

A hipótese deste trabalho é que alterações na contratilidade cardíaca já se manifestam em fase precoce devido à DM. Baseado nesta hipótese, o objetivo foi avaliar as alterações na atividade contrátil e elétrica em modelo experimental de diabetes em ratos em fase precoce. Esta avaliação foi feita de acordo com os seguintes itens:

- Avaliação da contratilidade por meio da medição do encurtamento de miócitos cardíacos isolados;
- Avaliação ecocardiográfica da estrutura e função cardíaca;
- Avaliação da atividade elétrica pela medição dos potenciais elétricos no epicárdio do coração e pelo eletrocardiograma.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritos os métodos utilizados para indução da diabetes em ratos Wistar, medição da contratilidade de miócitos cardíacos isolados obtidos a partir da dissociação enzimática do coração de ratos, realização da ecocardiografia e registro do eletrocardiograma. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP (Anexo A).

3.1 Desenho experimental

A figura 12 resume o desenho experimental utilizado com todas as medições feitas nos dois grupos experimentais, grupo controle e diabético.

Figura 12 – Desenho experimental com todas as medições realizadas no grupo controle e no grupo com animais diabéticos

Ratos Wistar machos de 8 semanas (massa entre 250 e 300 g)		
1º dia	Avaliação inicial: massa e glicemia	
	Indução da diabetes	
	Grupo controle (n=7)	Grupo diabético (n=8)
5º dia	Medição da glicemia	
14º dia	Medição da massa e glicemia	
	Ecocardiograma	
21º dia	Eletrocardiograma	
22º dia	Medição dos potenciais elétricos no epicárdio	
	Dissociação enzimática	
24º dia	Medição da variação do comprimento da célula	
	Medição da variação do comprimento do sarcômero	

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Animais

Ratos machos Wistar de 8 semanas, pesando entre 250 e 300 g, foram acomodados em até quatro animais por caixa e alojados no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP) em ambiente com temperatura controlada (22 °C – 24 °C) e ciclo de 12 horas claro/escuro. Água potável e comida foram oferecidos de modo irrestrito. Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=7) e grupo diabetes induzida por STZ (n=8).

3.3 Indução da diabetes

A DM foi induzida nos ratos Wistar por uma única injeção intravenosa de STZ (50 mg/Kg, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato (0,01 M, pH 4,5) na veia caudal. Os ratos foram anestesiados com gás isoflurano (Cristália, São Paulo) na concentração de 2,5 % a uma taxa de fluxo de oxigênio de 2,5 L/min. Após 14 dias de indução, os ratos com glicemia de jejum igual ou superior a 180 mg/dL foram considerados diabéticos (69).

A medição da glicose foi feita em gotas de sangue da cauda do animal utilizando-se um monitor de glicemia portátil (Accu-Chek, Roche, Basel, Suíça). As medições foram realizadas com os animais submetidos a quatro horas de jejum (69) e feitas antes da indução, 5 dias após a indução, para verificar a eficácia da aplicação da STZ e 14 dias após indução, para verificar a manutenção da diabetes. A massa corporal dos animais também foi medida em três momentos: antes da indução da diabetes, 14 dias após indução (para a medição do ecocardiograma) e 21 dias após indução (para a medição da contratilidade dos miócitos cardíacos isolados).

3.4 Ecocardiografia

A ecocardiografia foi obtida nos ratos do grupo diabético 14 dias após a indução com STZ. Para o grupo controle, a ecocardiografia foi obtida em animais com idade equivalente aos ratos do grupo diabético, ou seja, realizada em ratos de aproximadamente 10 semanas.

A anestesia foi induzida colocando-se cada rato em uma câmara de indução preenchida com 5 % de isoflurano a uma taxa de fluxo de oxigênio de 2,5 L/min. Após anestesia, o rato foi submetido a tricotomia na região torácica e posicionado sobre uma mesa aquecida (37 °C). As patas do animal foram fixadas nos eletrodos presente na mesa aquecida para monitorização do eletrocardiograma durante o exame de ecocardiografia. Durante todo o exame, o animal foi mantido anestesiado com isoflurano (concentração de 2,5 % de isoflurano a uma taxa de fluxo de oxigênio de 2,5 L/min) através de uma máscara facial.

A ecocardiografia transtorácica foi realizada com o equipamento de ultrassom VEVO 2100 (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá) equipado com transdutor de 13 MHz. Para análise no modo M, o transdutor foi posicionado na janela paraesternal (figura 13A) para obtenção das imagens no plano eixo curto do coração (figura 13B) ao nível dos músculos papilares (figura 13C). A partir da imagem bidimensional obtida no plano eixo curto foi posicionada uma linha para investigar o campo do ultrassom permitindo a análise do movimento do ventrículo ao longo do tempo para análise das estruturas cardíacas (figura 14). Os parâmetros medidos foram o diâmetro interno sistólico (DIV_{sis}) e diastólico do ventrículo esquerdo (DIV_{dia}), a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole ($PPVE_{sis}$) e diástole ($PPVE_{dia}$) e a espessura do septo interventricular na sístole (SIV_{sis}) e diástole (SIV_{dia}).

Os valores da massa do VE foram calculados a partir da fórmula de Devereaux (eq.

Figura 13 – Ecocardiografia para obtenção de imagens no modo M. A. Janela paraesternal em que o transdutor foi posicionado para obtenção de imagens no plano eixo curto do coração. B. Planos do coração com destaque para o plano eixo curto em vermelho. C. Feixe do ultrassom para obtenção das imagens no plano eixo curto do coração ao nível dos músculos papilares

Fonte: (44) e (70)

3.1)(71) que comparou dados de ecocardiograma com dados obtidos a partir de necropsia em humanos. Nesta fórmula, o volume é calculado assumindo que o VE possui uma geometria de um elipsóide prolato. Com algumas simplificações, como considerar a seção transversal deste elipsóide circular e altura igual ao dobro do diâmetro da seção transversal, chega-se que o volume é dado pelo diâmetro da seção transversal elevado ao cubo (conhecido como fórmula do cubo). Então, o volume total do VE é subtraído do volume da cavidade do VE fornecendo o volume do miocárdio que, multiplicado pela densidade e por um fator de correção fornece o valor da massa em mg. O valor da massa do VE e os valores estruturais foram normalizados pela massa corporal do animal.

$$\text{Massa do VE [mg]} = 0.8 \times [1.053 \times (\text{DIVE}_{\text{dia}} + \text{PPVE}_{\text{dia}} + \text{SIV}_{\text{dia}})^3 - \text{DIVE}_{\text{dia}}^3] \quad (3.1)$$

A espessura relativa da parede posterior (ERPP), que é um parâmetro que indica se a morfologia do VE está alterada e a fração de encurtamento (FEn), que expressa a alteração percentual na dimensão da cavidade foram calculados a partir dos valores estruturais pelas eqs. 3.2 e 3.3, respectivamente. O volume do VE na sístole e diástole (Vol VE_{sis} e Vol VE_{dia}, respectivamente) foram obtidos a partir da fórmula de Teicholz (eq. 3.4)(72) que adiciona fatores de correção na fórmula do cubo baseado em resultados obtidos experimentalmente a partir de ventriculografia permitindo a utilização da fórmula para cavidades com outros formatos. A fração de ejeção, que relaciona a quantidade de sangue que entra e sai do coração,

Figura 14 – Imagem no modo M obtida a partir da imagem obtida no plano eixo curto do coração. Na parte superior, a linha amarela foi posicionada para investigar o campo do ultrassom, permitindo a análise do movimento do ventrículo ao longo do tempo, mostrado na parte inferior da figura

SIV - espessura do septo interventricular na diástole; $DIVE_{dia}$ - diâmetro interno do VE na diástole; $DIVE_{sis}$ - diâmetro interno do VE na sistole; PPVE - espessura da parede posterior do VE. Fonte: Elaborada pelo autor

foi obtida a partir dos volumes do VE calculados pela fórmula de Teicholz (eq. 3.5) (73).

$$\text{Espessura relativa da parede posterior} = \frac{2 \times PPVE_{dia}}{DIVE_{dia}} \quad (3.2)$$

$$\text{Fração de encurtamento [\%]} = \frac{DIVE_{dia} - DIVE_{sis}}{DIVE_{dia}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Vol VE } [\mu\text{l}] = \frac{7 \times DIVE^3}{2.4 + DIVE} \quad (3.4)$$

$$\text{Fração de ejeção [\%]} = \frac{\text{Vol VE}_{dia} - \text{Vol VE}_{sis}}{\text{Vol VE}_{dia}} \times 100 \quad (3.5)$$

O ecocardiograma com Doppler pulsado foi utilizado para análise da função sistólica e diastólica. Para esta modalidade, o transdutor foi posicionado na janela apical (figura 15A) para obtenção das imagens no plano apical do coração (figura 15B) ao nível de visualização das quatro câmaras (figura 15C). Este plano fornece o melhor registro de fluxo já que o feixe do ultrassom está paralelo à direção do fluxo de sangue na válvula mitral.

A partir das imagens obtidas no plano apical foi escolhido o volume de amostragem onde foi feita a análise do fluxo. Para análise do fluxo transmitral, o volume de amostragem

Figura 15 – Ecocardiografia com Doppler pulsado. A. Janela apical em que o transdutor foi posicionado para obtenção de imagens no plano apical do coração. B. Planos do coração com destaque para o plano apical em vermelho. C. Feixe do ultrassom para obtenção das imagens no plano apical do coração permitindo visualização das quatro câmaras

Fonte: (44) e (70)

foi posicionado na saída da válvula mitral (figura 16A) permitindo o registro da variação do fluxo de sangue e a medição da velocidade de pico precoce (E) e tardia de enchimento (A) do ventrículo e o TRIV (figura 16B) e cálculo da relação E/A. Valores acima de um para esta relação são considerados normais, ou seja, o enchimento passivo que ocorre durante a fase precoce devido ao relaxamento do VE tem maior contribuição no enchimento do ventrículo durante a diástole comparado à fase tardia devido à contração dos átrios.

Figura 16 – Ecocardiografia com Doppler pulsado para análise do fluxo transmitral. A. Imagem do plano apical do coração em que é possível visualizar as quatro câmaras. O volume de amostragem, destacado em amarelo, foi posicionado na saída da válvula mitral. B. Registro de fluxo obtido na saída da válvula mitral a partir do Doppler pulsado

Fonte: Elaborada pelo autor

Para o Doppler tecidual, o volume de amostragem foi posicionado no anel mitral septal (figura 17A) permitindo o registro do movimento do miocárdio e a medição da velocidade de

pico precoce (E') e tardia de enchimento (A') do ventrículo e da velocidade de contração sistólica (S') (figura 17B). Além disso, foram calculados as relações E'/A' e E/E'.

Figura 17 – Ecocardiografia com Doppler tecidual para análise do movimento do miocárdio. A. Imagem do plano apical do coração em que é possível visualizar as quatro câmaras. O volume de amostragem, destacado em amarelo, foi posicionado no anel mitral septal. B. Registro de velocidade do miocárdio obtido no anel mitral septal a partir do Doppler tecidual

Fonte: Elaborada pelo autor

3.5 Obtenção do eletrocardiograma

A obtenção do eletrocardiograma foi realizada nos ratos do grupo controle e do grupo diabético. Para o último grupo, a medição foi realizada 21 dias após a indução da DM com STZ. Os animais foram anestesiados com gás isoflurano na concentração 5 % de isoflurano a uma taxa de fluxo de oxigênio de 2,5 L/min. Durante todo o exame, o animal foi mantido anestesiado com isoflurano na concentração de 2,5 % a 3 % de isoflurano a uma taxa de fluxo de oxigênio de 2,5 L/min através de uma máscara facial, de modo a manter a frequência cardíaca dos ratos entre 300 e 350 bpm.

Os animais foram dispostos em decúbito dorsal e tricotomizados na região torácica ventral. Os eletrodos foram dispostos na região tricotomizada de forma a registrar a derivação D1 (diferença de potencial entre o braço direito e braço esquerdo) por dez minutos. Os sinais foram amplificados (Animal BioAmp, ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e convertidos por um sistema analógico/digital (PowerLab 8/35, ADInstruments) em frequência de amostragem ajustada para 1000 Hz (figura 18A).

Os eletrocardiogramas obtidos foram analisados quanto aos seguintes parâmetros: duração do intervalo RR, duração do intervalo PR, duração da onda P, duração do intervalo QRS e duração do intervalo QT (figura 18B). Os parâmetros foram obtidos a partir da média de 20 batimentos seguidos de cada eletrocardiograma (módulo ECG Analysis do *software* LabChart 7.3.1, ADInstruments). Os valores do intervalo QT foram normalizados segundo a fórmula de Bazett normalizada (eq. 3.6) sendo f, o fator de normalização, igual a 150 ms (74).

$$QT_{\text{normalizado}}[\text{ms}] = \frac{QT}{\left(\frac{RR}{f}\right)^{1/2}} \quad (3.6)$$

Figura 18 – Eletrocardiograma para registro da atividade elétrica nos ratos. A. Descrição esquemática da medição do eletrocardiograma nos ratos. B. Registro típico do eletrocardiograma com os parâmetros avaliados na medição

Fonte: Elaborada pelo autor

3.6 Dissociação enzimática para obtenção de miócitos cardíacos isolados

Para obtenção de miócitos cardíacos isolados a partir do coração de ratos Wistar utilizou-se o método Langendorff de retro-perfusão pela aorta. A figura 19A mostra uma descrição esquemática do sistema Langendorff utilizado para a dissociação e, a figura 19B, uma foto do sistema durante um experimento de dissociação. O sistema é composto por um termômetro digital para medição da temperatura da solução perfundida; bomba peristáltica para perfusão da solução sob fluxo constante; serpentina por onde passa a solução e onde é realizada a troca de calor com a água para aquecimento que percorre a parte externa à serpentina, aquecendo a solução de perfusão; tubo para oxigenação das soluções; transdutor de pressão para medição da pressão da solução perfundida; e cânula onde o coração é colocado.

Após trinta minutos da aplicação da heparina (5000 U/kg, Cristália, SP), utilizada para prevenir coagulação do sangue e possível infarto do miocárdio, o animal foi anestesiado (tiopental, 50 mg/kg intraperitoneal (75)) e, após toracotomia, o coração foi retirado preservando-se o máximo possível da aorta para facilitar a canulação. Após a excisão o coração foi colocado em solução de dissociação gelada pré-oxigenada com a seguinte composição: 134 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM NaH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 1,2 mM MgSO_4 , 11 mM D-glicose, 1,25 mM CaCl_2 com pH de 7,4 a 23 °C (45). O coração foi canulado via aorta, montado no sistema Langendorff e perfundido com a mesma solução de dissociação por 10 minutos com fluxo de 5,5 ml/min. Antes de se iniciar a perfusão com a solução contendo

Figura 19 – Sistema Langendorff para dissociação enzimática. A. Descrição esquemática do sistema Langendorff utilizado para dissociação enzimática do coração de ratos Wistar. B. Foto do sistema durante um experimento de dissociação

Fonte: Elaborada pelo autor

enzimas, foi feita a perfusão com a solução de dissociação sem cálcio por 5 minutos, fluxo de 7,5 ml/min. Em seguida, mantendo-se o mesmo fluxo, a perfusão foi realizada com a solução de dissociação com 20 μM Ca^{2+} contendo a enzima colagenase tipo II (0,25 mg/ml; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, EUA). Esta solução foi recirculada, auxiliando a digestão por expor todo o tecido ao mesmo declínio gradual na atividade da enzima (45). A perfusão é mantida até o coração se tornar flácido e pálido e até que haja uma queda na pressão na saída do sistema Langendorff de aproximadamente 20 mmHg (intervalo de tempo de 20 a 30 minutos). A queda na pressão ocorre pois o fluxo de perfusão é constante e, com a dissociação, há uma redução na resistência do fluxo nas coronárias, causando a diminuição da pressão. A figura 20 mostra dois instantes durante a perfusão do coração em que é possível visualizar o efeito da perfusão com a enzima.

Após isto, o coração foi removido do sistema e o tecido cortado em pequenos fragmentos na solução de dissociação com 50 μM Ca^{2+} e triturados com uma pipeta de plástico. A solução contendo os pedaços foi filtrada por uma rede de malha e centrifugada a 35 g por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em solução de dissociação contendo 100 μM Ca^{2+} . Esta operação foi repetida mais três vezes de modo a aumentar gradativamente a concentração de cálcio até o valor final de 1 mM Ca^{2+} .

A figura 21 mostra miócitos cardíacos isolados obtidos por dissociação enzimática pelo método Langendorff. É possível observar que as células saudáveis apresentam formato alongado e padrão de estrias bem visível.

Figura 20 – Comparação entre dois instantes da perfusão com a solução contendo enzimas. A. Foto do coração no início da perfusão com a solução contendo enzimas. B. Foto ao fim da perfusão com a solução com enzimas, com o coração mais pálido se comparado com o início

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 – Imagens de miócitos cardíacos isolados obtidos por dissociação enzimática pelo método Langendorff. (A) aumento de 200x. (B) aumento de 400x

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7 Medição da contratilidade de miócitos cardíacos isolados

A medição da contratilidade dos miócitos cardíacos isolados foi realizada com um sistema de visualização das células e captura das imagens associado ao *software* IonWizard (IonOptix, Milton, MA, EUA). Nas subseções seguintes são apresentados o sistema de visualização utilizado, a calibração do *software* para a correta medição e o funcionamento do *software* para medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado e da variação do comprimento do sarcômero.

3.7.1 Visualização das células e captura das imagens

Os miócitos cardíacos isolados foram visualizados com o auxílio de um microscópio invertido (Eclipse TS-100, Nikon, Tóquio, Japão). As imagens foram captadas por um sistema de aquisição de imagens constituído por uma câmera CCD analógica MyoCam (IonOptix, Milton, MA, EUA), uma fonte de alimentação para o vídeo com controles de ganho e offset (Video Power, IonOptix, EUA) e placa de captura de vídeo (MV-510, MuTech). Na figura 22 é possível observar os componentes utilizados para visualização e captura das imagens das células.

Figura 22 – Imagem do sistema utilizado para medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado com destaque para os componentes utilizados para visualização e captura das imagens das células

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7.2 Calibração do *software* IonWizard

Uma calibração espacial foi realizada para obtenção dos valores de contratilidade do miócito cardíaco isolado. A calibração resultou em um fator de conversão utilizado pelo *software* relacionando o valor em *pixels*, obtido diretamente sobre a imagem com a célula, com um valor apropriado em μm . Para realizar esta calibração foi utilizada uma lâmina contendo uma escala com graduação de 0,01 mm como mostrado na figura 23.

Para cada lente objetiva do microscópio foi obtida uma imagem da lâmina com a escala. O *software* ImageJ foi utilizado para medir a distância em *pixels* entre dois segmentos da escala (em μm) e a razão dos valores foi utilizado como o fator de conversão $\mu\text{m}/\text{pixels}$. A figura 24 apresenta um exemplo de medição realizada para a lente objetiva de 40x. A medição da distância foi repetida cinco vezes de modo a obter uma melhor estimativa do valor medido.

Figura 23 – Imagem da lâmina contendo a escala com graduação de 0,01 mm utilizada para calibração. A imagem apontada pela seta azul apresenta a escala com aumento de 4x

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 24 – Imagem obtida do *software* ImageJ utilizado para calibração espacial do *software* lonWizard. À esquerda, uma foto obtida com a lente objetiva de 40x foi utilizada, com a linha vermelha traçada para obtenção da distância entre os dois segmentos da escala. À direita, o resultado desta distância em *pixels*

Fonte: Elaborada pelo autor

A tabela 2 apresenta os valores das médias das distâncias obtidas para as quatro lentes objetivas do microscópio e o valor da relação $\mu\text{m}/\text{pixels}$ adotado na análise com o *software* lonWizard. Para a lente de 4x foi realizada a medição entre segmentos a 50 μm de distância, enquanto que para os outros a medição foi feita entre segmentos a 10 μm de distância.

Tabela 2 – Valores obtidos durante o processo de calibração do *software* lonWizard para cada lente objetiva do microscópio

Lente objetiva	Distância real [μm]	Distância em pixels (média e desvio de 5 observações)	Relação $\mu\text{m}/\text{pixels}$ $\pm$ Desvio
4x	50	20,03 $\pm$ 0,14	2,49 $\pm$ 0,02
10x	10	10,07 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,01
20x	10	20,27 $\pm$ 0,44	0,49 $\pm$ 0,01
40x	10	41,01 $\pm$ 0,23	0,24 $\pm$ 0,01

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7.3 Estimulação elétrica dos miócitos cardíacos isolados

A medição da contratilidade foi realizada a partir das imagens captadas pelo sistema de visualização dos miócitos cardíacos isolados eletricamente estimulados. A estimulação elétrica dos miócitos cardíacos isolados foi feita com o estimulador MyoPacer (IonOptix, Milton, MA, EUA), com pulsos bipolares com 5 ms de duração do pulso, 25V de amplitude do pulso e frequência de 1 Hz. A solução com os miócitos cardíacos foi colocada em uma câmara (C-Stim, IonOptix, EUA) com eletrodos de platina para estimulação elétrica. A câmara possui um termistor para medição da temperatura do meio em que se encontra a célula e duas aberturas, para entrada e saída de soluções para estimulação química. A figura 25 apresenta, à esquerda, a fotografia da câmara e, à direita, detalhes do local em que as células são colocadas.

Figura 25 – Imagens da câmara utilizada para estimulação elétrica dos miócitos cardíacos e controle da temperatura da solução com células. À esquerda, fotografia da câmara utilizada nos experimentos. À direita, detalhes da câmara com o local em que as células são colocadas

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7.4 Controle da temperatura na câmara de estimulação

O aquecimento da câmara de estimulação em que os miócitos cardíacos isolados são colocados foi realizado a partir de um substrato de polímero (polietileno tereftalato - PET) revestido com um filme condutor de óxido de índio dopado com estanho (ITO, do inglês *Indium tin Oxide*)(60 Ω /sq, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EUA). Foram criados pontos de contato elétrico fixados por colagem (cola consutora Wire Glue, Idolon Technologies, MA, EUA) no substrato de PET com ITO permitindo a passagem de corrente elétrica no filme condutor e a consequente liberação de calor permitindo o aumento da temperatura da solução na câmara.

O controle da temperatura foi feito através de um controle proporcional-integrativo-derivativo (PID) implementado em uma placa microcontrolada (Arduino Uno, Ivrea, Itália). Pulsos de PWM (do inglês *Pulse Width Modulation*) alimentam a base do transistor que

controla o fluxo de corrente passando pelo PET revestido com ITO. A figura 26 apresenta um esquemático da montagem realizada com a placa microcontroladora para controle e para medição da temperatura com o termistor presente na câmara utilizada para medição da contratilidade.

Figura 26 – Ilustração da montagem realizada para medição da temperatura utilizando o termistor e placa de PET revestida com ITO presente na câmara para os experimentos de medição da contratilidade

Fonte: Elaborada pelo autor

3.7.5 Medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado

O *software* IonWizard apresenta um módulo específico para detecção de bordas, sendo possível determinar a posição de cada extremidade da célula. A diferença entre estas posições fornece o comprimento da célula analisada e, quando ocorre a contração, é possível estimar a variação do comprimento da célula. A figura 27 apresenta uma imagem do *software* com o módulo para detecção de bordas que é composto pela imagem de vídeo gerada pela câmera acoplada ao microscópio e pelo gráfico de intensidade da imagem do vídeo. Ainda na figura, na parte inferior, é possível ver detalhes da detecção de bordas. Na imagem de vídeo (circunferência vermelha) duas linhas verticais delimitam a região da célula que será examinada em busca da borda, enquanto que uma linha horizontal determina a linha com os dados que serão utilizados para localização da posição da borda. Já no gráfico de intensidade (circunferência azul) as linhas verticais são os mesmos limites configurados na imagem de vídeo e a linha horizontal é o limiar que representa o valor de intensidade utilizado no algoritmo de detecção de borda.

Cinco opções podem ser utilizadas para se determinar a posição da borda de acordo com o limiar: *above* - a borda está localizada no primeiro ponto acima do limiar; *below* - borda localizada no primeiro ponto abaixo do limiar; *locked* - a borda é fixada no ponto médio entre os limites de detecção; *peakAbove* - a borda está localizada no valor máximo do primeiro pico

Figura 27 – Imagem do *software* IonWizard. A parte superior mostra o módulo correspondente à detecção de bordas com a imagem de vídeo gerada pela câmera acoplada ao microscópio e o gráfico de intensidade da imagem. A parte inferior, à esquerda, mostra o posicionamento das linhas na imagem de vídeo e a detecção de borda realizada pelo *software*. À direita, é possível ver os mesmos limites de detecção mais o limiar escolhido para detecção da borda

Fonte: Elaborada pelo autor

acima do limiar (para ser considerado um pico, o valor de intensidade deve se iniciar abaixo do limiar, cruzá-lo e retornar para um valor abaixo); *peakBelow* - a borda está localizada no valor mínimo do primeiro pico abaixo do limiar (para ser considerado um pico, o valor de intensidade deve se iniciar acima do limiar, cruzá-lo e retornar para um valor acima). No caso da figura 27, para a borda esquerda, a opção de posição de borda ajustada foi o *above*, o que significa que para valores acima do limiar o *software* localiza corretamente a borda do miócito. Para a borda direita, a opção de posição de borda ajustada foi o *peakBelow*.

O registro de encurtamento durante a estimulação elétrica é realizado individualmente para cada miócito cardíaco isolado. A figura 28 mostra a detecção da borda do miócito com o *software* em três instantes de tempo durante a estimulação elétrica da célula: antes do estímulo elétrico; imediatamente após o estímulo elétrico, com a célula contraída; e após a contração, com a célula já relaxada. Com a detecção da variação das bordas da célula, é possível registrar o encurtamento em resposta ao estímulo elétrico, como mostra a figura 29. Na parte superior da figura é possível observar o sinal de variação do comprimento do miócito cardíaco, em resposta a um estímulo elétrico. Os estímulos também são registrados e indicados na parte inferior do gráfico. Com o indicador do estímulo elétrico é possível obter a variação média do comprimento do miócito cardíaco isolado a partir dos encurtamentos individuais e os escolhidos para o cálculo da média, apresentado na parte inferior da figura 29.

O sinal de variação média do comprimento do miócito cardíaco isolado foi utilizado para análise do sinal e obtenção dos parâmetros. Para a análise, cinco intervalos de tempo são

Figura 28 – Imagem do *software* IonWizard em três instantes de tempo durante a estimulação elétrica de um miócito cardíaco

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 29 – Imagem do *software* IonWizard mostrando o sinal de variação do comprimento do miócito cardíaco isolado durante a estimulação elétrica e o sinal obtido a partir da média de encurtamentos

Fonte: Elaborada pelo autor

identificados via *software* no sinal de variação média do comprimento: linha de base, deflexão, pico, recuperação e retorno à linha de base. A linha de base se refere ao comprimento inicial da célula, a deflexão à contração do miócito, o pico ao valor de encurtamento máximo, recuperação ao relaxamento do miócito cardíaco e retorno à linha de base se refere ao retorno ao comprimento inicial da célula. A figura 30 mostra um sinal de variação média do comprimento do miócito cardíaco com cada intervalo destacado por uma cor: linha de base destacada em amarela; deflexão em vermelho; pico em azul; recuperação em verde; e retorno à linha de base em roxo.

Para obtenção dos parâmetros sobre cada intervalo, uma função analítica é ajustada

Figura 30 – Imagem do *software* IonWizard com o sinal de variação média do comprimento do miócito cardíaco isolado. Cinco intervalos estão identificados no sinal e cada um destacado por uma cor: linha de base destacada em amarela; deflexão em vermelho; pico em azul; recuperação em verde; e retorno à linha de base em roxo

Fonte: Elaborada pelo autor

via *software* IonWizard para cada intervalo permitindo a obtenção de parâmetros sobre o sinal de contração mesmo com a presença de ruídos. Os dados de cada intervalo foram ajustados por uma série de Taylor (eq. 3.7). Os coeficientes a_n foram calculados a partir dos valores de comprimento da célula medidos ao longo do tempo no respectivo intervalo e a ordem N é proporcional ao número de dados disponível e do intervalo analisado. Para a linha de base, por exemplo, a ordem do polinômio é ajustada para $N=1$, enquanto que para a deflexão, a ordem é ajustada para um valor entre 7 e 11 (76).

$$Comprimento(t) = \sum_{n=0}^N a_n t^n \quad (3.7)$$

Os parâmetros obtidos da análise e a respectiva definição de cada um deles estão presentes na tabela 3 e foram mostrados na figura 30. Os valores de intervalos de tempo de encurtamento foram medidos considerando como instante de tempo inicial o instante do estímulo elétrico e os valores de intervalos de tempo de relaxamento foram medidos considerando como instante de tempo inicial o instante do máximo encurtamento.

3.7.6 Medição da variação do comprimento do sarcômero

Além do módulo para detecção de bordas, o *software* IonWizard possui um módulo para medição do comprimento do sarcômero. A medição é realizada sobre uma região de interesse (ROI, do inglês *region-of-interest*). Esta região, mostrada pelo retângulo roxo sobre a célula na figura 31, é definida pelo usuário, sendo que tanto suas dimensões quanto sua

Tabela 3 – Características do transiente do sinal de contração analisado pelo *software* Ionwizard

Sigla	Nome [Unidade]	Definição
C_{inicial}	Comprimento inicial [μm]	Valor do comprimento da célula antes do início do estímulo elétrico
v_{enc}	Velocidade de encurtamento [$\mu\text{m/s}$]	Máxima taxa de variação do comprimento durante a contração do miócito
$t_{V_{\text{enc}}}$	Tempo até máxima velocidade de encurtamento [s]	Intervalo de tempo entre o instante do estímulo elétrico e o instante da máxima velocidade de encurtamento
$\text{Amp}[\%]$	Altura do pico com relação à linha de base [%]	Valor do encurtamento (em porcentagem) com relação ao comprimento inicial
t_{pico}	Tempo até o pico [s]	Intervalo de tempo entre o instante do estímulo elétrico e o instante do pico de contração
v_{rel}	Velocidade de relaxamento [$\mu\text{m/s}$]	Máxima taxa de variação do comprimento durante o relaxamento do miócito
$t_{V_{\text{rel}}}$	Tempo até máxima velocidade de relaxamento [s]	Intervalo de tempo entre o instante do pico de contração e o instante da máxima velocidade de relaxamento
$t_{50\% \text{ C}_{\text{inicial}}}$	Tempo até 50% da linha de base [s]	Intervalo de tempo entre o instante do pico de contração até o instante em que se atinge 50% do comprimento inicial

Fonte: (76)

posição podem ser ajustados. Para maximizar a precisão da medição recomenda-se incluir ao menos 7 sarcômeros no ROI (77).

O processamento envolvido no cálculo do comprimento do sarcômero pode ser descrito em 5 etapas. A primeira delas consiste na obtenção do traçado de densidade derivado do ROI. Para cada *pixel* da imagem é assinalado um valor, variando de 0, preto, até 255, branco. Para uma linha horizontal da imagem é possível obter um traçado de densidade, sendo possível observá-lo no *software* pela curva na cor preta (figura 31). Devido a alternância entre as bandas A e I na célula (figura 5), o traçado de densidade apresenta uma aparência sinusoidal, com o comprimento de onda representando o comprimento do sarcômero.

As duas próximas etapas consistem em ajustar o traçado de densidade para que seja possível aplicar a transformada de Fourier espacial sobre o sinal. Inicialmente, o traçado de densidade é multiplicado por uma janela de Hamming, definida por uma função cosseínodal,

Figura 31 – Imagem do *software* IonWizard com o módulo para medição do comprimento do sarcômero. A parte superior da figura mostra a imagem de vídeo gerada pela câmera acoplada ao microscópio e a inferior os sinais derivados da imagem de vídeo utilizados para a medição do comprimento do sarcômero

Fonte: Elaborada pelo autor

truncando o sinal e fazendo com que descontinuidades nas bordas sejam minimizadas. Com o uso da janela, sarcômeros localizados no meio do ROI terão um peso maior para a determinação do comprimento do sarcômero do que os mais próximos das extremidades, já que são multiplicados por um valor bem mais alto. O gráfico em azul da parte inferior da figura 31 mostra o resultado da aplicação da janela. A etapa seguinte consiste em preencher com zeros o traçado multiplicado pela janela, até que a quantidade de pontos alcance uma potência de 2, permitindo a utilização do algoritmo responsável pela FFT.

A penúltima etapa para estimar o comprimento do sarcômero consiste na aplicação da FFT. O inverso da frequência do pico de maior amplitude representa o comprimento do sarcômero. É possível definir um limite inferior e superior para o comprimento do sarcômero segundo o valor fisiológico esperado. Em ratos, o valor do comprimento médio do sarcômero é de 1,8 μm (78).

O valor de comprimento fornecido pelo espectro de potência é normalizado em sarcômeros por *pixel*. Portanto, a última etapa do *software* é converter esta medida para *pixels* por sarcômero e, para encontrar o valor apropriado em μm é necessário utilizar o fator de conversão obtido através da calibração espacial.

A figura 32 mostra a medição do comprimento do sarcômero com o método da FFT em três instantes diferentes: antes do estímulo elétrico; imediatamente após o estímulo elétrico, com a célula contraída; e após a contração, com a célula já relaxada. No segundo instante, é possível observar o deslocamento do pico no espectro do sinal da FFT com o encurtamento do sarcômero devido ao estímulo elétrico. O sinal de variação do comprimento do sarcômero é similar ao sinal obtido com o comprimento da célula (figura 33) e a análise e obtenção dos parâmetros seguem o mesmo procedimento feito para o comprimento do miócito.

Figura 32 – Imagem do *software* IonWizard em três instantes de tempo durante a estimulação elétrica de um miócito cardíaco, sendo possível visualizar o deslocamento do pico no espectro do sinal da FFT

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 33 – Imagem do *software* IonWizard mostrando o sinal de variação do comprimento do sarcômero durante a estimulação elétrica e o sinal obtido a partir da média de encurtamentos do sarcômero

Fonte: Elaborada pelo autor

3.8 Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos

A medição dos potenciais elétricos no epicárdio do coração de ratos foi feita durante a perfusão com a solução de dissociação no sistema Langendorff (79). Para a adoção desta metodologia de medição foi necessário realizar a fabricação de uma estrutura para manter os eletrodos em contato com o epicárdio, bem como a fabricação dos próprios eletrodos; a definição do sistema de aquisição dos sinais obtidos; e desenvolvimento do algoritmo para filtragem e análise dos eletrogramas. Estas etapas da metodologia são descritas nos tópicos a seguir.

3.8.1 Fabricação dos eletrodos

A fabricação dos eletrodos foi realizada manualmente utilizando fios de prata e um maçarico portátil. A partir do diâmetro do eletrodo foi possível determinar o comprimento do fio a ser fundido utilizando a eq. 3.8. Assim, o comprimento do fio calculado foi fundido lentamente na chama do maçarico e, naturalmente, formou-se uma pequena esfera incandescente (figura 34).

$$\text{Comprimento do fio} = \frac{2}{3} \times \frac{(D_{\text{eletrodo}})^3}{(D_{\text{fio}})^2} \quad (3.8)$$

Figura 34 – Processo de produção dos eletrodos por fusão do fio de prata. (A) Fusão do fio e formação da esfera. (B) É possível ver uma pequena esfera na ponta da pinça. (C) Acompanhamento da medida da esfera com um paquímetro durante sua fabricação

Fonte: Arquivo pessoal

3.8.2 Fabricação da estrutura para os eletrodos

A estrutura para manter os eletrodos em contato com o epicárdio do coração de ratos foi feita com silicone de grau médico de uso irrestrito (Nusil Technology, Carpinteria, CA, EUA). Eletrodos de 0.6 mm de diâmetro foram presos a estrutura com a utilização de cola de silicone (Silastic Medical Adhesive Silicone Type A, Dow Corning Corp., Midland, MI, EUA).

A figura 35, à esquerda, mostra a estrutura criada posicionada ao redor de um coração de rato e, à direita, um esquema com a disposição dos eletrodos na estrutura.

Figura 35 – À esquerda, estrutura de silicone fabricada para manter os eletrodos em contato com o epicárdio do coração. À direita, o esquema com a disposição dos eletrodos presos na estrutura e as distâncias representadas em mm

Fonte: Elaborada pelo autor

3.8.3 Sistema de aquisição

O registro dos sinais elétricos epicárdicos foi realizado com sete condicionadores de sinais do tipo universal (figura 36) (Gould Electronics, Chandler, AZ, EUA). Neste sistema, cada sinal proveniente de um eletrodo em contato com o coração foi filtrado e amplificado por um condicionador de sinal universal. Após isto, os sinais foram convertidos por um sistema A/D (DI-720, DataQ Instruments, Akron, OH, EUA) em frequência de amostragem de 8000 Hz.

Figura 36 – Sistema de aquisição com condicionadores de sinal universal utilizado para medição dos potenciais elétricos do coração

Fonte: Elaborada pelo autor

3.8.4 Algoritmo para filtragem e análise dos eletrogramas

O processamento e análise dos sinais obtidos pelos eletrodos em contato com o epicárdio do coração de rato foram feitos em um algoritmo no MATLAB (MathWorks Inc., Nattick, MA, EUA). Após filtragem com os filtros analógicos do sistema de aquisição, o processamento realiza o ajuste do ganho de acordo com o respectivo canal ao qual o eletrodo está ligado e a correção da linha de base. A identificação do QRS utiliza o mínimo valor da derivada do sinal de cada eletrograma. Esta máxima deflexão que ocorre durante a despolarização é conhecida como instante de ativação (80).

A amplificação (ganho) de cada canal foi determinada com o auxílio da aplicação de um pulso elétrico de 6,25 mV de amplitude (estimulador elétrico MyoPacer). A razão entre o valor obtido pelos condicionadores de sinal universal do sistema de aquisição e a amplitude do sinal de entrada aplicado nos eletrodos representa o valor da amplificação do sistema (tabela 4). Os canais 1 e 3 contam com pré-amplificadores e por isso o valor do ganho é muito mais alto se comparado com os outros.

Os sinais captados pelos eletrodos apresentam uma grande variação na linha de base. Para eliminar esta variação e facilitar a identificação de eventos no sinal, foi implementado um filtro de média móvel com uma janela de 600 ms suficiente para eliminar os picos no sinal. O sinal filtrado é subtraído do sinal original resultando em um sinal com a linha de base mais estável e sem *offset*.

Para a detecção do QRS um filtro derivativo foi aplicado sobre o sinal com linha de base ajustada o que permitiu estimar os instantes de ativação para o eletrograma proveniente de cada eletrodo. A detecção do mínimo valor da derivada é realizada com a função *findpeaks* do MATLAB e a frequência cardíaca foi avaliada em um trecho de 1 minuto do sinal, três minutos após início da perfusão.

3.9 Análise dos dados

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para o teste de normalidade. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão para amostras com distribuição normal e mediana e amplitude interquartil (25% e 75%) para as amostras que não possuem distribuição normal. A comparação entre grupo controle e diabético foi realizada pelo teste t de Student, para

Tabela 4 – Valores de ganho calculados para cada canal do sistema de aquisição com os condicionadores de sinal universal

Canal	1	2	3	4	5	6	7
Ganho	701,78	78,60	757,73	68,20	64,79	82,89	80,56

Fonte: Elaborada pelo autor

os dados com distribuição normal e Mann-Whitney para os dados sem distribuição normal. Significância estatística foi definida para $P < 0,05$. Todos os testes e cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Indução da diabetes

A glicemia dos ratos Wistar foi medida antes da indução com STZ e 5 e 14 dias após a indução. O gráfico da figura 37 mostra a evolução da glicemia após a administração da STZ. Já a figura 38 mostra a comparação dos valores de glicemia entre os grupos controle e diabético 14 dias após a indução da diabetes pela STZ.

Figura 37 – Valores de glicemia dos ratos do grupo diabético (n=8 animais). * $P \leq 0,001$

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 38 – Comparação dos valores de glicemia entre os grupos controle e diabético 14 dias após indução. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados. * $P \leq 0,001$

Fonte: Elaborada pelo autor

O gráfico da figura 39 mostra a comparação de massa corporal entre os animais do grupo controle e dos animais do grupo diabético 14 dias após indução. Os valores de massa corporal utilizados nesta comparação foram obtidos imediatamente antes dos experimentos para medição de contratilidade do miócito cardíaco isolado.

Figura 39 – Comparação dos valores de massa entre os grupos controle e diabético 14 dias após indução. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados. * $P \leq 0,001$

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2 Ecocardiografia

Os valores dos parâmetros morfológicos obtidos na ecocardiografia no modo M antes da normalização e após a normalização pela massa corpórea são apresentados na tabela 5. Na tabela 6 estão os valores dos parâmetros ecocardiográficos ERPP, FE, FEn e massa do VE calculados a partir da análise pelo modo M. Por último, os valores dos parâmetros ecocardiográficos obtidos pelo Doppler pulsado no fluxo transmitral e pelo Doppler pulsado tecidual são apresentados na tabela 7.

4.3 Obtenção do eletrocardiograma

Os valores dos parâmetros obtidos na eletrocardiograma são apresentados na tabela 8.

4.4 Medição da contratilidade do miócito cardíaco isolado

4.4.1 Medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado

Os parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do miócito cardíaco isolado que apresentaram diferença estatística entre grupo controle e diabético

Tabela 5 – Parâmetros ecocardiográficos antes da normalização e após a normalização pela massa corpórea obtidos a partir da análise pelo modo M. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados

	Controle (n=5)	Diabético (n=8)
SIV_{dia} [mm]	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1*
SIV_{sis} [mm]	2,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2*
DIVE_{dia} [mm]	9,1 ± 0,7	7,6 ± 0,5*
DIVE_{sis} [mm]	5,1 ± 0,8	4,9 ± 0,5
PPVE_{dia} [mm]	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1*
PPVE_{sis} [mm]	2,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1*
SIV_{dia}/MC x10⁻³ [mm/g]	3,3 ± 1,7	4,6 ± 0,4
SIV_{sis}/MC x10⁻³ [mm/g]	6,3 ± 2,5	7,9 ± 1,2
DIVE_{dia}/MC x10⁻³ [mm/g]	24,4 ± 1,5	28,0 ± 2,2*
DIVE_{sis}/MC x10⁻³ [mm/g]	11,0 ± 5,6	18,2 ± 1,5*
PPVE_{dia}/MC x10⁻³ [mm/g]	3,4 ± 1,9	4,9 ± 0,5
PPVE_{sis}/MC x10⁻³ [mm/g]	6,2 ± 3,0	8,0 ± 0,6
MC [g]	377 ± 39	272 ± 26

SIV_{dia} - espessura do septo interventricular na diástole; SIV_{sis} - espessura do septo interventricular na sístole; DIVE_{dia} - diâmetro interno do VE na diástole; DIVE_{sis} - diâmetro interno do VE na sístole; PPVE_{dia} - espessura da parede posterior do VE na diástole; PPVE_{sis} - espessura da parede posterior do VE na sístole; MC - massa corpórea. **P* < 0,02.

Tabela 6 – Parâmetros ecocardiográficos calculados a partir da análise pelo modo M. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados

	Controle (n=5)	Diabético (n=8)
Massa VE [mg]	774,5 ± 80,2	650,4 ± 74,2*
Massa VE/MC [mg/g]	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,5*
ERPP	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
FE [%]	73,4 ± 5,9	62,1 ± 5,0*
FEn [%]	44,2 ± 4,0	34,7 ± 3,6*

ERPP - espessura relativa da parede posterior; FE - fração de ejeção; FEn - fração de encurtamento. **P* < 0,02.

são apresentados na forma de gráfico *box plot* (figura 40) e outros parâmetros de contratilidade que permaneceram inalterados são apresentados na tabela 9.

4.4.2 Medição da variação do comprimento do sarcômero

Os parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do sarcômero que apresentaram diferença estatística entre grupo controle e diabético são apresentados na forma de gráfico *box plot* (figura 41) e outros parâmetros de contratilidade que permaneceram inalterados são apresentados na tabela 10.

Tabela 7 – Parâmetros ecocardiográficos obtidos pelo Doppler pulsado no fluxo transmitral e pelo Doppler pulsado tecidual. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados

	Controle (n=5)	Diabético (n=8)
TRIV [ms]	22,2 ± 3,2	24,5 ± 2,8
A [mm/s]	555,6 ± 82,8	412,0 ± 104,1*
E [mm/s]	984,4 ± 109,2	771,2 ± 157,9*
E/A	1,8 ± 0,4	2,0 ± 0,5
A' [mm/s]	-56,1 ± 19,9	-46,3 ± 18,1
E' [mm/s]	-57,9 ± 28,7	-58,0 ± 16,4
E'/A'	1,3 ± 1,0	1,5 ± 0,7
S' [mm/s]	46,9 ± 5,7	38,1 ± 3,7*
E/E'	-20,9 ± 9,8	-14,1 ± 4,5

TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico; A - velocidade diastólica tardia medida pelo Doppler no fluxo transmitral; E - velocidade diastólica precoce medida pelo Doppler no fluxo transmitral; A' - velocidade diastólica tardia medida pelo Doppler tecidual; E' - velocidade diastólica precoce medida pelo Doppler tecidual; S' - velocidade sistólica do miocárdio. * $P < 0,02$.

Tabela 8 – Parâmetros obtidos a partir da análise do eletrocardiograma. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados

	Controle (n=7)	Diabético (n=7)
Intervalo RR [ms]	159.0 ± 8.7	190.4 ± 18.1*
Freq. Cardíaca [bpm]	378.3 ± 20.7	317.8 ± 30.9*
Intervalo PR [ms]	54.66 ± 3.81	52.30 ± 3.51
Duração da onda P [ms]	9.15 ± 2.22	14.15 ± 3.20*
Intervalo QRS [ms]	10.18 ± 2.33	12.41 ± 3.37
Intervalo QT [ms]	28.94 ± 3.79	42.85 ± 15.45
Intervalo QT normalizado [ms]	28.13 ± 3.68	38.32 ± 14.12

* $P \leq 0.005$

Tabela 9 – Parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do miócito que permaneceram inalterados nos grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas

	Controle (n=29)	Diabético (n=25)
C _{inicial} [μm]	107,39 (98,02 – 121,41)	110,06 (94,37 – 117,68)
V _{enc} [μm/s]	-130,73 (-178,12 – -82,62)	-74,19 (-128,35 – -59,75)
Amp [%]	3,46 (2,47 – 4,92)	4,00 (1,66 – 5,03)
V _{rel} [μm/s]	82,83 (48,9 – 120,84)	59,91 (41,96 – 134,61)

C_{inicial} - comprimento inicial; v_{enc} - velocidade de encurtamento; Amp % - encurtamento em relação ao comprimento inicial; v_{rel} - velocidade de relaxamento. Valores apresentados como mediana e interquartis (25% e 75%)

Figura 40 – Gráficos dos parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do miócito que apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas

t_{venc} - tempo até a máxima velocidade de encurtamento; t_{pico} - tempo até o máximo encurtamento; t_{vrel} - tempo até a máxima velocidade de relaxamento; $t_{50\% \text{ Cínicial}}$ - tempo para a célula atingir 50% do comprimento inicial após contração. $*P \leq 0.03$. Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 10 – Parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do sarcômero que permaneceram inalterados nos grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas

	Controle (n=31)	Diabético (n=33)
$C_{inicial}$ [μm]	1,75 (1,71 – 1,81)	1,75 (1,67 – 1,78)
V_{enc} [$\mu m/s$]	-2,16 (-3,31 – -1,57)	-1,82 (-2,72 – -1,30)
Amp [%]	3,72 (2,17 – 4,61)	4,12 (2,87 – 5,78)
V_{rel} [$\mu m/s$]	1,49 (1,08 – 2,64)	1,55 (0,77 – 2,74)

$C_{inicial}$ - comprimento inicial; v_{enc} - velocidade de encurtamento; Amp % - encurtamento em relação ao comprimento inicial; v_{rel} - velocidade de relaxamento. Valores apresentados como mediana e interquartis (25% e 75%)

Figura 41 – Gráficos dos parâmetros de contratilidade obtidos da medição da variação do comprimento do sarcômero que apresentaram diferença estatística entre os grupos controle e diabético. Os valores de n correspondem ao número de células utilizadas

t_{venc} - tempo até a máxima velocidade de encurtamento; t_{pico} - tempo até o máximo encurtamento; t_{vrel} - tempo até a máxima velocidade de relaxamento; $t_{50\% Cinicial}$ - tempo para a célula atingir 50% do comprimento inicial após contração. $*P \leq 0.001$. Fonte: Elaborada pelo autor

4.5 Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos

A figura 42 mostra um exemplo de sinais obtidos com os eletrodos epicárdicos em contato com um coração de rato no sistema Langendorff. A figura 43 exemplifica o resultado da aplicação do filtro sobre o eletrograma captado por um dos eletrodos em contato com o epicárdio do coração de rato. À esquerda é possível observar o sinal original, em azul, junto com o sinal filtrado, em vermelho. À direita da figura é possível observar o sinal (em vermelho) resultado da subtração do sinal original com o sinal filtrado.

A figura 44 apresenta o resultado da aplicação do filtro derivativo no sinal do eletrograma com a linha de base corrigida. Após a aplicação do filtro derivativo é possível localizar o instante em que a derivada é mínima. A figura 45 mostra um exemplo do resultado desta localização. A partir dos instantes identificados foi possível estimar a frequência cardíaca para

Figura 42 – Imagem com os sinais obtidos com os eletrodos epicárdicos no coração de rato. À esquerda, os sinais captados nos 6 diferentes eletrodos. À direita, a disposição dos eletrodos, com a localização de cada um deles

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 43 – Exemplo mostrando o resultado da aplicação do filtro sobre o eletrograma. À esquerda é possível observar o sinal original, em azul, junto com o sinal filtrado, em vermelho. À direita da figura é possível observar o sinal (em vermelho) com linha de base corrigida resultado da subtração do sinal original com o sinal filtrado

Fonte: Elaborada pelo autor

cada experimento (tabela 11).

Tabela 11 – Valores de frequência cardíaca obtida durante a perfusão com o sistema Langendorff. Os valores de n correspondem ao número de animais utilizados

	Controle (n=4)	Diabético (n=4)
Frequência (bpm)	228 ± 19	214 ± 22

Figura 44 – Gráfico com o eletrograma original de um eletrodo (em azul) e o respectivo sinal da derivada (em vermelho)

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 45 – Exemplo do resultado da identificação do instante em que a derivada é mínima (marcado em vermelho no gráfico) no eletrograma

Fonte: Elaborada pelo autor

5 DISCUSSÃO

5.1 Indução da diabetes

A DM induzida pela aplicação da STZ provocou redução do ganho de massa ao longo dos 21 dias após indução, sendo que a massa corporal do grupo controle apresentou maior valor comparado com o grupo diabético (figura 39). Além da redução do ganho de massa, os ratos que receberam a injeção de STZ apresentaram um aumento da glicemia após 5 dias da indução (aumento de 265%) confirmando a indução da DM pela STZ. O valor da glicemia se manteve elevado como confirmado com a medição 14 dias após a indução da DM.

5.2 Ecocardiografia

Os resultados obtidos com a ecocardiografia mostraram mudanças morfológicas e funcionais no coração de ratos diabéticos com STZ comparados com o grupo controle. O grupo diabético apresentou aumento no diâmetro do VE tanto na sístole quanto na diástole e aumento na massa do VE. Como a espessura da parede posterior não apresentou diferença entre os grupos, isto indica que houve um quadro de hipertrofia excêntrica que é uma condição que surge em decorrência de sobrecarga de volume. Estas alterações estão de acordo com outros estudos similares envolvendo a avaliação ecocardiográfica de ratos com DM induzidos pela STZ (26) (81). Inclusive, Weytjens et al. fez a avaliação com a ecocardiografia em diferentes intervalos de tempo após a indução da DM (duas, quatro, oito e dezesseis semanas) e em todos os intervalos foram encontradas alterações no diâmetro do VE, mostrando que esta alteração já se manifesta precocemente.

Quanto a função cardíaca, foi observada uma diminuição nos parâmetros A e E sugerindo o início de uma possível disfunção diastólica. Entretanto, a relação E/A não se mostrou diferente entre os grupos o que mostra que a função diastólica se encontra preservada. O valor de TRIV, que também é utilizado para caracterizar a função diastólica, se manteve inalterado nos dois grupos. Com a progressão da DM possivelmente estes valores se alterarão como mostram outros estudos já realizados com intervalos de tempo após a indução da DM maiores (27) (69). As variações observadas nos parâmetros S', FE e FEn indicam o início de uma possível disfunção sistólica, embora o valor de FE ainda se encontre dentro dos valores normais (82). Estudo como de Waddingham et al. (83) avaliou o efeito da DM na função cardíaca em intervalo similar após a indução da DM e também observou alterações diastólicas e sistólicas no VE de ratos. A causa desta disfunção no VE pode estar relacionada a alterações a nível celular que ocorrem devido à DM.

5.3 Obtenção do eletrocardiograma

O eletrocardiograma é uma ferramenta capaz de avaliar os efeitos da CD. Ratos com DM induzida tendem a apresentar uma diminuição na frequência cardíaca e na variabilidade da frequência cardíaca e aumento dos intervalos QRS e QT. Pelos resultados obtidos, foi possível visualizar que houve uma diminuição da frequência cardíaca nos ratos do grupo diabético. Entretanto, durante a medição do eletrocardiograma, a concentração do anestésico isoflurano foi variada de modo a manter a frequência cardíaca dentro do intervalo fisiológico normal de ratos Wistar (250-450 bpm) (84). Desta maneira, não é possível assumir que a diminuição na frequência cardíaca encontrada é resultado da diabetes pois, um dos efeitos do anestésico, é a diminuição na frequência. Além disso, o anestésico também influencia a atividade do sistema nervoso autônomo, inviabilizando a análise da variabilidade da frequência cardíaca (85).

No grupo diabético, houve um aumento na duração da onda P. A diferença neste valor reflete uma possível alteração na condução atrial causada pelo diabetes e foi relatada em outros estudos utilizando ratos com DM induzida pela STZ com a medição foi realizada oito semanas após indução (86) (87). As possíveis causas para esta alteração na duração da onda P são fibrose intersticial, que acarreta em diminuição na velocidade de condução elétrica, e diminuição na expressão de proteínas encontradas nas junções *gap* entre as células cardíacas, como a conexina 40 e a conexina 43, que ocasiona também redução na velocidade de condução. Outro ponto importante é que também foi encontrada uma disfunção contrátil no átrio caracterizada pela diminuição da onda A avaliada pelo Doppler com análise do fluxo transmitral sugerindo uma possível relação entre as alterações mecânicas e elétricas encontradas.

5.4 Medição da contratilidade de miócitos cardíacos isolados

A utilização do miócito cardíaco isolado permite estudar as bases microscópicas da contração cardíaca (88), possibilitando entender os mecanismos envolvidos na contração da célula sem as influências elásticas da matriz extracelular, bem como das células adjacentes.

Os resultados obtidos com a medição da contratilidade pela variação do comprimento da célula e pela variação do comprimento do sarcômero mostram efeitos semelhantes: três semanas após a indução da DM houve alterações na fase de encurtamento e relaxamento da célula sugerindo que a contratilidade cardíaca do miócito isolado foi modificada. A figura 46 mostra a comparação entre dois sinais de encurtamento obtidos do grupo controle e diabético.

O valor de v_{enc} (velocidade de encurtamento) caracteriza a velocidade com a qual a célula se contrai ou, de outra forma, como a concentração de Ca^{2+} no citosol aumentou. O valor t_{venc} (instante até a máxima velocidade de contração), assim como v_{enc} , caracteriza a velocidade de resposta da célula, porém a interpretação é um pouco diferente entre estes dois parâmetros: duas células podem ter a mesma velocidade de encurtamento, mas o intervalo de tempo para a célula iniciar a contração pode ser diferente. A mesma interpretação pode ser

Figura 46 – Comparação entre dois sinais de encurtamento obtidos do grupo controle e diabético

Fonte: Elaborada pelo autor

feita para v_{rel} e t_{Vrel} , estando as duas variáveis diretamente relacionadas ao relaxamento da célula.

Comparando os resultados entre o grupo controle e diabético é possível notar que houve este efeito: os valores de t_{Venc} e t_{Vrel} apresentaram uma diferença estatística enquanto que os valores de v_{enc} e v_{rel} não apresentaram. Além disso, outros dois parâmetros relacionados ao intervalo de tempo de transiente (t_{pico} e $t_{50\% Cinical}$) também apresentaram uma diferença, com aumento nesses valores em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos aqui estão consistentes com outros estudos avaliando a contratilidade de miócitos cardíacos isolados (23) (89) (90) sendo que, nestes estudos, a análise foi feita após um intervalo de tempo de indução da diabetes maior, entre 8 e 12 semanas. Nos estudos que avaliaram alterações precoce nos miócitos cardíacos isolados não foi feita a avaliação dos intervalos de tempo (t_{Venc} , t_{Vrel} , t_{pico} e $t_{50\% Cinical}$) e não foi encontrada alteração nos valores v_{enc} , Amp % e v_{rel} (91) (92). Inclusive, Delucchi et al. avaliaram o efeito da DM em miócitos isolados do coração de ratos em três instantes diferentes, 1, 3 e 8 semanas após indução pela STZ, sendo que as alterações na contratilidade das células só foram identificadas após 8 semanas, com diminuição na amplitude de contração. Isto sugere que as alterações na amplitude de contração, que não foram identificadas neste estudo, podem vir a se manifestar com a progressão da DM.

A alteração na homeostase do cálcio é apontada como a causadora das alterações encontradas na contratilidade do miócito cardíaco isolado. Para o encurtamento, estudos apontam diminuição da atividade dos receptores RyR como responsável pelas alterações (93) (94). Uma das possíveis causas para esta diminuição de atividade é que, a falta de insulina devido a diabetes causa alteração nos metabolismos de glicose e lipídios provocando alteração na expressão gênica, levando a mudanças na expressão celular de proteínas, como as proteínas do receptor RyR. Além disso, a alteração na expressão de proteínas pode também ser a causa

para as alterações encontradas no relaxamento. Como estudos na literatura apontam, há alterações tanto nas proteínas presentes na SERCA (23) (95) (96) como também alterações nas proteínas presentes no trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (23) (24). O aumento do fosfolambam, que é um inibidor da SERCA, também altera no relaxamento do miócito cardíaco isolado (23). Além da alteração na expressão gênica, a hiperglicemia causa aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e carbonila (RCS). O ROS, que é gerado pelas mitocôndrias, ativa a proteína quinase C no citoplasma que, por sua vez, inibe a SERCA (97) e causa fosforilação das proteínas contráteis (98). O RCS também inibe a atuação da SERCA (96) causando alteração no relaxamento da célula.

As alterações encontradas nos miócitos cardíacos isolados podem ser apontadas como uma das possíveis causas para as alterações identificadas ao nível do órgão pelo ecocardiograma. Entretanto, é importante ressaltar que diversos mecanismos tem seu comportamento modificado devido ao efeito da DM e também podem contribuir para a disfunção no VE, como mostra a figura 47.

Figura 47 – Mecanismos propostos para a disfunção diastólica e sistólica no VE que ocorre devido a DM

Fonte: Modificada de (99)

5.5 Medição dos potenciais elétricos do epicárdio do coração de ratos

A medição dos potenciais elétricos pode fornecer informações quanto a atividade elétrica do coração. Os sinais obtidos do epicárdio do coração de ratos foram utilizados para medição da frequência cardíaca sendo que, estudos mostram que a DM causa uma redução na frequência (34) (90). Os ratos Wistar apresentam uma frequência cardíaca entre 330 a 480 bpm (100) e, quando isolado, o coração apresenta uma redução na frequência cardíaca por estar desnervado.

Neste estudo, não foram identificadas diferenças entre os valores de frequência entre grupo controle e diabético. Possivelmente, com a progressão da DM, ocorrerá uma diminuição na frequência cardíaca, como mostrado por outro estudo que registrou uma diminuição 12 semanas após indução da DM (23). O uso de vários eletrodos permite estudar a distribuição dos potenciais ao longo do epicárdio do coração. O sistema construído apresentou dificuldades quanto à manutenção do posicionamento dos eletrodos em experimentos diferentes. Também o uso de poucos eletrodos, limitado pelo número de condicionadores de sinais, impõe uma limitação adicional.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram identificar alterações no modelo de DM por STZ. Foi observada uma correlação entre as alterações da contratilidade observadas diretamente ao nível celular através da medição da variação do comprimento da célula e do sarcômero com as alterações na morfologia e função sistólica em decorrência da DM. As avaliações permitiram identificar a resposta fisiopatológica existente após um intervalo relativamente curto da indução da DM. A combinação de diferentes métodos de estudo permitiu relacionar as respostas sistêmica e celular. Esse tipo de estudo, incluindo diferentes medições, permite um melhor entendimento dos mecanismos de ação da doença assim como possíveis resultados avaliando os efeitos do uso de medicamentos tais como o resveratrol ou o fasudil.

REFERÊNCIAS

- 1 INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 8. ed. Bélgica, 2017.
- 2 VAZQUEZ, G. et al. Comparison of Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist/Hip Ratio in Predicting Incident Diabetes: A Meta-Analysis. *Epidemiol Rev*, v. 29, n. 1, p. 115–128, 2007.
- 3 OKOSHI, K. et al. Diabetic cardiomyopathy. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, n. 2, p. 160–167, 2007.
- 4 GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of medical physiology*. 11. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2006. 1152 p.
- 5 GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 831 p.
- 6 KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Ed.). *Berne & Levy Physiology*. 6. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2008. 864 p.
- 7 SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diabetes Tipo 1*. 2017. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/profissionais/diabetes-tipo-1>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2017.
- 8 LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, v. 204, n. 1, p. 1–11, 2010.
- 9 OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J*, v. 27, n. 4, p. 269–273, 2012.
- 10 AL-AWAR, A. et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res*, v. 2016, 2016.
- 11 KLÖTING, I.; BRANDT, J. van den; KUTTLER, B. Genes of SHR Rats Protect Spontaneously Diabetic BB/OK Rats from Diabetes: Lessons from Congenic BB.SHR Rat Strains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 283, n. 2, p. 399–405, 2001.
- 12 KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 43, n. 1, p. 3–10, 2010.
- 13 TOKUYAMA, Y. et al. Evolution of beta-Cell Dysfunction in the Male Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes*, v. 44, n. 12, p. 1447–1457, 1995.
- 14 GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.*, v. 119, n. 1, p. 85–90, 1976.
- 15 LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216–226, 2008.
- 16 ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*, v. 12, p. 1–7, 2013.

- 17 SILVA, V. D.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, v. 36, n. 1, 2015.
- 18 HAYAT, S. A. et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clinical Science*, v. 107, n. 6, p. 539–557, 2004.
- 19 SPECTOR, K. S. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Cardiol*, v. 21, n. 12, p. 885–887, 1998.
- 20 BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation*, v. 115, n. 25, p. 3213–3223, 2007.
- 21 PIERCE, G. N.; DHALLA, N. S. Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 13, n. 12, p. 1063–1069, 1981.
- 22 ZHAO, X.-Y. et al. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. Disfunción cardíaca en ratas diabéticas y reducción de la actividad Ca^{2+} -ATPasa en retículo sarcoplásmico. *J. Physiol. Biochem.*, v. 62, n. 1, p. 1–8, 2006.
- 23 CHOI, K. M. et al. Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 283, n. 4, p. H1398–H1408, 2002.
- 24 HATTORI, Y. et al. Diminished function and expression of the cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *J Physiol*, v. 527, n. Pt 1, p. 85–94, 2000.
- 25 TESHIMA, Y. et al. Diminished Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase and Ryanodine Sensitive Ca^{2+} Channel mRNA in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 32, n. 4, p. 655–664, 2000.
- 26 STRUNZ, C. M. C. et al. Down-regulation of fibroblast growth factor 2 and its co-receptors heparan sulfate proteoglycans by resveratrol underlies the improvement of cardiac dysfunction in experimental diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 40, n. Supplement C, p. 219–227, 2017.
- 27 JOFFE, I. I. et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin-dependent diabetic rat: Noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 34, n. 7, p. 2111–2119, 1999.
- 28 LUCK, C. et al. Differential Regulation of Cardiac Function and Intracardiac Cytokines by Rapamycin in Healthy and Diabetic Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1–17, 2017.
- 29 GALDERISI, M. Diastolic Dysfunction and Diabetic Cardiomyopathy: Evaluation by Doppler Echocardiography. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 48, n. 8, p. 1548–1551, 2006.
- 30 HO, C. Y.; SOLOMON, S. D. A Clinician's Guide to Tissue Doppler Imaging. *Circulation*, v. 113, n. 10, p. e396–e398, 2006.

- 31 NAGUEH, S. F. et al. Doppler Tissue Imaging: A Noninvasive Technique for Evaluation of Left Ventricular Relaxation and Estimation of Filling Pressures. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 30, n. 6, p. 1527–1533, 1997.
- 32 RODRIGUEZ, L. et al. Assessment of mitral annular dynamics during diastole by Doppler tissue imaging: Comparison with mitral Doppler inflow in subjects without heart disease and in patients with left ventricular hypertrophy. *American Heart Journal*, v. 131, n. 5, p. 982–987, 1996.
- 33 ISAAZ, K. et al. Quantitation of the motion of the cardiac base in normal subjects by Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*, v. 6, n. 2, p. 166–176, 1993.
- 34 BADOLE, S. L. et al. Cardioprotective Activity of *Pongamia pinnata* in Streptozotocin-Nicotinamide Induced Diabetic Rats. *Biomed Res Int*, v. 2015, 2015.
- 35 HOWARTH, F. C. et al. Long term effects of streptozotocin induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Experimental Physiology*, v. 90, n. 6, p. 827–835, 2005.
- 36 P.T., A. S.; JOSEPH, P. K.; JACOB, J. Automated Diagnosis of Diabetes Using Heart Rate Variability Signals. *Journal of Medical Systems*, v. 36, n. 3, p. 1935–1941, 2012.
- 37 BERNE, R. B. et al. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1034 p.
- 38 DE TOMBE, P. P. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation. *J. Biomech.*, v. 36, n. 5, p. 721–730, 2003.
- 39 WIDMAIER, E.; RAFF, H.; STRANG, K. *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. 11. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Higher Education, 2007. 800 p.
- 40 BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002.
- 41 YASUDA, S.-I. et al. A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.*, v. 281, n. 3, p. H1442–H1446, 2001.
- 42 METZGER, J. M. et al. Effects of Myosin Heavy Chain Isoform Switching on Ca^{2+} -Activated Tension Development in Single Adult Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, v. 84, n. 11, p. 1310–1317, 1999.
- 43 SKRZYPIEC-SPRING, M. et al. Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 55, n. 2, p. 113–126, 2007.
- 44 SERVIER. *SMART Servier Medical Art*. 2017. Disponível em: <<http://smart.servier.com/category/anatomy-and-the-human-body/cardiovascular-system/heart/>>. Acesso em: 02 de dezembro de 2017.
- 45 LOUCH, W. E.; SHEEHAN, K. A.; WOLSKA, B. M. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J Mol Cell Cardiol*, v. 51, n. 3, p. 288–298, 2011.
- 46 BELL, R. M.; Mocanu, M. M.; Yellon, D. M. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 50, n. 6, p. 940–950, 2011.

- 47 MUIR, A. R. The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat*, v. 101, n. Pt 2, p. 239–261, 1967.
- 48 ZIMMERMAN, A. N. E.; HÜLSMANN, W. C. Paradoxical Influence of Calcium Ions on the Permeability of the Cell Membranes of the Isolated Rat Heart. *Nature*, v. 211, n. 5049, p. 646–647, 1966.
- 49 PIPER, H. M. The calcium paradox revisited An artefact of great heuristic value. *Cardiovasc. Res.*, v. 45, n. 1, p. 123–127, 2000.
- 50 HARDING, S. E. et al. Contractile responses of isolated adult rat and rabbit cardiac myocytes to isoproterenol and calcium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 20, n. 7, p. 635–647, 1988.
- 51 GOMES, P. A. P.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development. *Biomed. Eng. IEEE Trans. On*, v. 48, n. 6, p. 630–636, 2001.
- 52 MARCHINI, G. S.; CESTARI, I. N.; CESTARI, I. A. Sistema de medição da força de contração em miócitos cardíacos isolados. In: *XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2016*. Foz do Iguaçu: Anais, 2016. p. 325–328.
- 53 SWEITZER, N. K.; MOSS, R. L. Determinants of loaded shortening velocity in single cardiac myocytes permeabilized with alpha-hemolysin. *Circulation Research*, v. 73, n. 6, p. 1150–62, 1993.
- 54 PALMER, R. E.; BRADY, A. J.; ROOS, K. P. Mechanical measurements from isolated cardiac myocytes using a pipette attachment system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 270, n. 2, p. C697–C704, 1996.
- 55 VELDEN, J. v. d. et al. Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc. Res.*, v. 38, n. 2, p. 414–423, 1998.
- 56 PUCEAT, M. et al. Neurohormonal control of calcium sensitivity of myofilaments in rat single heart cells. *Circulation Research*, v. 67, n. 2, p. 517–24, 1990.
- 57 DE CLERCK, N. M. et al. Sarcomere distribution patterns in single cardiac cells. *Biophys.J.*, v. 35, n. 1, p. 237–242, 1981.
- 58 FAN, D.; WANNEBURG, T.; TOMBE, P. P. Decreased myocyte tension development and calcium responsiveness in rat right ventricular pressure overload. *Circulation*, v. 95, n. 9, p. 2312–2317, 1997.
- 59 LE GUENNEC, J.-Y. et al. A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: length dependence of passive and active tension. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 22, n. 10, p. 1083–1093, 1990.
- 60 NISHIMURA, S. et al. Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions. *Am.J.Physiol. Heart Circ.Physiol.*, v. 287, p. H196–H202, 2004.
- 61 KIM, K. et al. Calibrated micropost arrays for biomechanical characterisation of cardiomyocytes. *Micro and Nano Letters*, v. 6, n. 5, p. 317–322, 2011.

- 62 BALABAN, N. Q. et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, v. 3, n. 5, p. 466–472, 2001.
- 63 DELBRIDGE, L.; ROOS, K. P. Optical methods to evaluate the contractile function of unloaded isolated cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 29, n. 1, p. 11–25, 1997.
- 64 MYERS, J. et al. Phase-locked loop measurement of sarcomere length with high time resolution. *Biomed. Eng. IEEE Trans. On*, n. 6, p. 463–466, 1982.
- 65 ROOS, K. P.; TAYLOR, S. R. High-speed video imaging and digital analysis of microscopic features in contracting striated muscle cells. *Opt. Eng.*, v. 32, n. 2, p. 306–313, 1993.
- 66 GANNIER, F. et al. Measurements of sarcomere dynamics simultaneously with auxotonic force in isolated cardiac cells. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 40, n. 12, p. 1226–1232, 1993.
- 67 PHILIPS, C. M.; DUTHINH, V.; HOUSER, S. R. A simple technique to measure the rate and magnitude of shortening of single isolated cardiac myocytes. *Biomed. Eng. IEEE Trans. On*, n. 10, p. 929–934, 1986.
- 68 STEADMAN, B. W. et al. A video system for measuring motion in contracting heart cells. *Biomed. Eng. IEEE Trans. On*, v. 35, n. 4, p. 264–272, 1988.
- 69 CRUZ, P. L. *Ação do resveratrol sobre proteoglicanos de membrana presentes no músculo cardíaco em modelo animal de cardiomiopatia diabética*. 72 p. Dissertação — Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- 70 SOLOMON, S. D. *Essential Echocardiography: A Practical Handbook with DVD*. 1. ed. [S.l.]: Humana Press, 2007. 458 p.
- 71 DEVEREUX, R. B. et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am. J. Cardiol.*, v. 57, n. 6, p. 450–458, 1986.
- 72 TEICHHOLZ, L. E. et al. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am. J. Cardiol.*, v. 37, n. 1, p. 7–11, 1976.
- 73 SALEMI, V. M. C. et al. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. *Eur J Echocardiogr*, v. 6, n. 1, p. 41–46, 2005.
- 74 KMECOVA, J.; KLIMAS, J. Heart rate correction of the QT duration in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 641, n. 2, p. 187–192, 2010.
- 75 PAIVA, P.; MAFFILI, V.; SANTOS, A. *Curso de manipulação de animais de laboratório*. Salvador, 2005.
- 76 IONOPTIX. *Monotonic Transient Analysis Parameters*. Massachusetts, USA, 2012. 9 p.
- 77 IONOPTIX. *IonWizard 6.3 - Aquisition*. Massachusetts, USA, 2012. 178 p.
- 78 FRATICELLI, A. et al. Morphological and contractile characteristics of rat cardiac myocytes from maturation to senescence. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 257, n. 1, p. H259–H265, 1989.

- 79 MARCHINI, G. S.; CESTARI, I. N.; CESTARI, I. A. Experimental method for recording epicardium potentials and cardiac myocyte shortening. In: *Computing in Cardiology – CinC 2017*. Rennes: [s.n.], 2017. v. 44, p. 1–4.
- 80 TAGGART, P. et al. Developing a novel comprehensive framework for the investigation of cellular and whole heart electrophysiology in the in situ human heart: Historical perspectives, current progress and future prospects. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 115, n. 2–3, p. 252–260, 2014.
- 81 WEYTJENS, C. et al. Doppler myocardial imaging in the diagnosis of early systolic left ventricular dysfunction in diabetic rats. *European Journal of Echocardiography*, v. 9, n. 3, p. 326–333, 2008.
- 82 WATSON, L. E. et al. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *Journal of the American Society of Echocardiography*, v. 17, n. 2, p. 161–167, 2004.
- 83 WADDINGHAM, M. T. et al. Chronic Rho-kinase inhibition improves left ventricular contractile dysfunction in early type-1 diabetes by increasing myosin cross-bridge extension. *Cardiovasc Diabetol*, v. 14, 2015.
- 84 HRAPKIEWICZ, K.; COLBY, L.; DENISON, P. *Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction*. 4 edition. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. 448 p.
- 85 KATO, M. et al. Spectral Analysis of Heart Rate Variability during Isoflurane Anesthesia. *Anesthes.*, v. 77, n. 4, p. 669–674, 1992.
- 86 WATANABE, M. et al. Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 303, n. 1, p. H86–H95, 2012.
- 87 LI, B.; PAN, Y.; LI, X. Type 2 diabetes induces prolonged p-wave duration without left atrial enlargement. *J Korean Med Sci*, v. 31, n. 4, p. 525–534, 2016.
- 88 KRUEGER, J. W.; FORLETTI, D.; WITTENBERG, B. A. Uniform sarcomere shortening behavior in isolated cardiac muscle cells. *J Gen Physiol*, v. 76, n. 5, p. 587–607, 1980.
- 89 SMAIL, M. M. A. et al. Regional effects of streptozotocin induced diabetes on shortening and calcium transport in epicardial and endocardial myocytes from rat left ventricle. *Physiological Reports*, v. 4, n. 22, p. 1–11, 2016.
- 90 HOWARTH, F. C. et al. The effects of heavy long-term exercise on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca^{2+} in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 24, n. 4, p. 278–285, 2010.
- 91 DELUCCHI, F. et al. Resveratrol treatment reduces cardiac progenitor cell dysfunction and prevents morpho-functional ventricular remodeling in type-1 diabetic rats. *PLOS ONE*, v. 7, n. 6, p. e39836, 2012.
- 92 CAGALINEC, M.; WACZULÍKOVÁ, I.; ULI, O. Morphology and contractility of cardiac myocytes in early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Physiol. Res.*, v. 62, p. 13.
- 93 BIDASEE, K. R.; DINCER, U. D.; BESCH, H. R. Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Pharmacol.*, v. 60, n. 6, p. 1356–1364, 2001.

- 94 MOORE, C. J. et al. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor RyR2 and sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase SERCA2 in diabetes. *Mol Cell Biochem*, v. 376, n. 1, p. 121–135, 2013.
- 95 ZHANG, L. et al. Altered Calcium Homeostasis Does Not Explain the Contractile Deficit of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes*, v. 57, n. 8, p. 2158–2166, 2008.
- 96 SHAO, C. H. et al. Carbonylation Contributes to SERCA2a Activity Loss and Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, v. 60, n. 3, p. 947–959, 2011.
- 97 WANG, M. et al. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca^{2+} cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol*, v. 47, n. 1, p. 209–218, 2010.
- 98 LIU, B. F. et al. Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages in diabetic mice: relevance to the formation of advanced glycation end products. *Diabetes*, v. 48, n. 10, p. 2074–2082, 1999.
- 99 MIKI, T. et al. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev*, v. 18, n. 2, p. 149–166, 2013.
- 100 JOHN HOPKINS UNIVERSITY. *Species Specific information: rat*. 2017. Disponível em: <<http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2017.

APÊNDICE A – PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

Os resultados obtidos ao longo do doutorado foram apresentados nos seguintes congressos:

- **EMBC 2016** - 38th *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* com o trabalho intitulado *An automated perfusion system for measuring contractile force in isolated cardiomyocytes*.
- **CBEB 2016** - XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica com o trabalho intitulado Sistema de medição da força de contração em miócitos cardíacos isolados.
- **CinC 2017** - *Computing in Cardiology 2017* com o trabalho intitulado *Experimental Method for Recording Epicardium Potentials and Cardiac Myocyte Shortening*.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 17/04/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **061/15** intitulado: **“Estudo da Contração do Miócito Cardíaco Isolado do Coração de Ratos”** que utilizará **24** animais da espécie **rato**, apresentado pela Comissão Científica do INCOR.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Idágene Aparecida Cestari

Pesquisador (a) Executante: Gustavo Shimabukuro Marchini

CEUA-FMUSP, 17 de Abril de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais