

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carla Isabel Dias Barros

**Implementação e parametrização de um sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos provenientes de biopsias miocárdicas humanas**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Carla Isabel Dias Barros

**Implementação e parametrização de  
um sistema de avaliação funcional de  
cardiomiócitos provenientes de  
biopsias miocárdicas humanas**

Dissertação de Mestrado  
Engenharia Biomédica  
Ramo Electrónica Médica

Trabalho realizado sob a orientação do  
**Professor Doutor Paulo Mendes**  
Co-orientador

**Professora Doutora Inês Falcão Pires**

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A  
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

“Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pena.”

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Adelino Leite Moreira por ter possibilitado a realização deste trabalho no Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

À Professora Doutora Inês Falcão Pires e ao Professor Doutor Paulo Mendes pelos ensinamentos, pelas críticas e sugestões, pela disponibilidade que demonstraram ao longo deste trabalho.

À Patrícia e à Daniela, grandes companheiras e amigas, e a todos os funcionários e investigadores do Serviço de Fisiologia que tão bem me acolheram.

Aos meus professores do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, pelos conhecimentos transmitidos e dedicação na sua tarefa de formar.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha avó pela paciência, compreensão e apoio ao longo desta jornada.

Agradeço a todos os que, de uma forma ou de outra, colaboraram para que este trabalho se tornasse possível.

## RESUMO

A Insuficiência Cardíaca (IC) encontra-se associada a uma elevada mortalidade e morbidade. Esta patologia resulta de alterações agudas ou crónicas da função cardíaca. Várias são as técnicas que permitem uma avaliação das propriedades contrácteis do miocárdio, como a ecocardiografia, a avaliação hemodinâmica, e o estudo de músculo papilar ou de cardiomiócitos isolados.

O trabalho realizado teve como principais objetivos a implementação de um sistema de medição de força em cardiomiócitos isolados e a avaliação da força nestas células.

Coelhos brancos Neo-zelandeses foram administrados com doxorubicina (Doxo, 1mg/Kg, n=10) ou com uma dose salina equivolumétrica (Controlo, n=15), durante 8 semanas, sendo periodicamente avaliados ecocardiograficamente. A função cardíaca foi avaliada em músculos papilares isolados e analisado o efeito da adiponectina e da insulina na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina.

O equipamento, composto por um transdutor de força e por um controlador de comprimento, foi instalado e permitiu a realização de medições isométricas em cardiomiócitos provenientes dos ápices ventriculares dos coelhos, extraindo-se a força passiva ( $T_p$ ), a força ativa ( $T_a$ ) e a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio ( $pCa_{50}$ ). A relação  $T_p/T_a$  diminuiu significativamente nos animais do grupo Doxo, dados consistentes com o fenótipo de cardiomiopatia dilatada confirmado ecocardiograficamente. Não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos restantes parâmetros analisados.

A performance dos músculos papilares provenientes dos dois grupos foi semelhante. Tanto a adiponectina como a insulina resultaram em efeitos inotrópico negativo e lusitrópico positivo. No entanto, não se verificaram diferenças significativas na avaliação da contractilidade em músculos papilares.

Concluiu-se que a indução de IC pela doxorubicina induz um fenótipo de cardiomiopatia dilatada que se fez acompanhar por uma diminuição da rigidez miocárdica tal como expressa na diminuição significativa da relação  $T_p/T_a$  no grupo Doxo.

A implementação do sistema de avaliação da função miocárdica ao nível do cardiomiócito foi bem sucedida e abre novos caminhos para a avaliação da contractilidade e propriedades passivas miocárdicas, podendo assumir uma grande importância no diagnóstico e estudo de doenças cardíacas ao nível celular.

## ABSTRACT

Heart failure (HF) is associated with high morbidity and mortality. This syndrome results from acute and chronic changes in cardiac function. Nowadays, some methodologies allow an evaluation of myocardial contractile properties, such as echocardiography, hemodynamics assessment as well as isolated cardiomyocytes and papillary muscles functional studies.

The present work aims to implement of a system especially designed for force measurements in isolated cardiomyocytes.

New Zealand white rabbits were treated with doxorubicin (Doxo, 1mg/Kg, n=10) or with an equivolumetric dose of saline (Ctrl, n=15), administered intravenously into the marginal ear vein twice weekly for 8 weeks. Echocardiographic evaluation was performed periodically. The cardiac function was evaluated in isolated papillary muscles and the adiponectin and insulin effects on doxorubicin induced cardiomyopathy were analyzed.

The apparatus, composed by a force transducer and a length controller, was installed and allowed to acquire isometric force measurements in cardiomyocyte from rabbits left ventricular apex. The passive tension ( $T_p$ ), the active tension ( $T_a$ ) and the total tension ( $T_t$ ) was obtained, as well as the myofilaments calcium sensitivity ( $pCa_{50}$ ). The ratio  $T_p/T_a$  decreased in Doxo group and the rest results didn't present significant differences.

The papillary muscles performance in two groups, Ctrl and Doxo, was similar. Both adiponectin and insulin resulted in negative inotropic and positive lusitropic effects. However, there were no significant differences in the assessment of contractility in papillary muscles.

We conclude that the doxorubicin induced HF leads to a dilated cardiomyopathy phenotype, which was accompanied by a decrease of myocardial stiffness as expressed in a significant decrease of ratio  $T_p/T_a$  in Doxo group.

The implementation of the system for myocardial function evaluation at cardiomyocyte level was successful and provide new tools to evaluate myocardial contractility and passive properties, playing an important role in study and diagnosis of cardiac diseases at cellular level.

# ÍNDICE

Agradecimentos .....	iv
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Índice de figuras .....	x
Índice de tabelas .....	xiii
Abreviaturas .....	xiv
1 Introdução .....	1
1.1 Objetivos .....	2
1.2 Contribuições .....	2
2 Morfologia cardíaca .....	4
2.1 Cardiomiócitos .....	4
2.1.1 Proteínas miofilamentares .....	6
2.1.2 Matriz extracelular .....	8
2.2 Estiramento .....	8
2.3 Excitação-contração da célula cardíaca .....	8
2.4 Função cardíaca .....	12
3 Sistemas de avaliação da função contráctil .....	14
3.1 Estudo estrutural e funcional ecocardiográfico .....	14
3.2 Estudo funcional hemodinâmico .....	16
3.3 Estudos funcionais em músculo papilar isolado .....	17
3.3.1 Medições isométricas da força .....	18
3.3.2 Medições isotónicas da força .....	19
3.4 Estudo funcional de cardiomiócitos isolados .....	20
4 Implementação de sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos isolados ...	23

4.1	Sistema de medição de força .....	23
4.1.1	Transdutor de força.....	24
4.1.2	Controlador de comprimento .....	28
4.1.3	Interface analógico-digital .....	32
4.1.4	Dispositivo de teste .....	33
4.1.5	Micromanipuladores .....	34
4.1.6	Sistema de visualização.....	34
4.2	Montagem e calibração do equipamento .....	35
4.2.1	Ajuste do motor e do controlador de comprimento .....	36
4.2.2	Ajuste do transdutor de força .....	39
4.2.3	Ajuste do sistema de visualização.....	42
4.3	Protocolo de estiramento do cardiomiócito .....	42
4.4	Protocolo de medição de força .....	43
4.5	Análise de dados.....	44
5	Métodos experimentais de avaliação da função cardíaca .....	46
5.1	Modelo animal.....	46
5.2	Avaliação ecocardiográfica .....	47
5.3	Estudos funcionais em músculos papilares .....	47
5.4	Estudos funcionais em cardiomiócitos isolados.....	49
5.4.1	Biópsias.....	50
5.4.2	Isolamento mecânico .....	50
5.4.3	Ajuste do comprimento do sarcómero .....	51
5.4.4	Protocolo .....	52
5.5	Análise estatística .....	52
6	Resultados.....	54

6.1	Implementação de um sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos isolados .....	54
6.2	Estudos funcionais em músculos papilares .....	57
6.3	Estudos funcionais em cardiomiócitos isolados .....	62
7	Discussão.....	65
7.1	Implementação de um sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos isolados .....	65
7.2	Estudos funcionais em músculos papilares .....	68
7.3	Estudos funcionais em cardiomiócitos isolados .....	71
8	Conclusão.....	73
8.1	Perspetivas futuras .....	74
	Bibliografia .....	76
	Apêndices.....	80
	Apêndice 1 – Funções do programa ASI 600A.....	80
	Apêndice 2 – Protocolo de estiramento .....	81
	Apêndice 3 – Protocolo de medição de força.....	82
	Apêndice 4 – Ficheiro de dados .....	83

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos miócitos cardíacos. Os cardiomiócitos são compostos por miofibrilas, cada uma contendo miofilamentos constituídos por actina e miosina. A miosina está ancorada à linha-Z pela titina. O sarcómero, a unidade básica contráctil, situa-se entre duas linhas-Z (Adaptado de [12]).	5
Figura 2 - Representação esquemática do Sarcómero (Adaptado de [10]).	5
Figura 3 - Representação esquemática do sensor de estiramento ao nível dos discos-Z (Adaptado de [10]).	6
Figura 4 - Composição dos miofilamentos cardíacos. Os filamentos finos são compostos por moléculas de miosina, cada molécula contendo duas cabeças globulares em cada extremidade. Os filamentos finos são constituídos por actina, tropomiosina, e troponina (troponina-T (Tn-T), troponina-C (Tn-C) e troponina-I (Tn-I) (adaptado de [12]).	7
Figura 5 - Estrutura anatómica dos túbulos transversos e do retículo sarcoplasmático numa fibra muscular (adaptado de [15]).	9
Figura 6 - Papel do Cálcio no acoplamento excitação-contração cardíaco (Adaptado de [12]).	10
Figura 7 - Encurtamento do sarcómero e o deslizamento dos filamentos. O cálcio liga-se à troponina-C (Tn-C) possibilitando a ligação actina-miosina, formando as pontes-cruzadas. Removendo o cálcio, inibe-se a ligação actina-miosina e as pontes-cruzadas cessam, voltando o sarcómero ao seu comprimento de relaxamento (Adaptado de [12]).	11
Figura 8 - Ecocardiograma Modo M das cavidades ventriculares direita (VD) e esquerda (VE) [22].	14
Figura 9 - Janelas e planos ecocardiográficos (Adaptado de [23]).	15
Figura 10 - Diferentes <i>setups</i> para determinação da força do músculo papilar.	18
Figura 11 - Modelo para a contração em pré-carga e pós-carga do músculo papilar, em que A representa o músculo em repouso, B a contração com estiramento sem encurtamento visível, e C a contração com encurtamento externo (Adaptado de [11]).	19
Figura 12 - Cardiomiócitos isolados (escala em $\mu\text{m}$ ).	21
Figura 13 - Representação em diagrama de blocos dos vários componentes que compõe o <i>setup</i> .	23
Figura 14 - Representação esquemática do transdutor de força [42].	24
Figura 15 - Principais tipos de condensadores capacitivos (adaptado de [43]).	25
Figura 16 - Representação do transdutor de força e do eixo de atuação da força (eixo AA).	27
Figura 17 - Representação do Controlador de comprimento de alta velocidade [47].	28
Figura 18 - Diagrama de blocos de um controlador em malha aberta, e representação esquemática da atuação de um motor quando, por exemplo, se dá ordem para girar $30^\circ$ (Adaptado de [48]).	29
Figura 19 - Diagrama de blocos de um controlo em malha fechada, onde existe realimentação, e representação da atuação do motor com unidade de controlo (adaptado de [48]).	30
Figura 20 - Esquemática do controlo on-off.	31
Figura 21 - Esquemática do controlo proporcional.	31
Figura 22 - Esquemática do controlo integral.	32

Figura 23 - Representação Esquemática do dispositivo de Teste, com a entrada e a saída de água proveniente do regulador térmico. ....	33
Figura 24 - Selecção de uma região de interesse (ROI) e cálculo do comprimento do sarcómero (SL) a partir do gráfico ACF da região de interesse. ....	34
Figura 25 - Integração dos componentes do setup. Braços mecânicos dos transdutor e controlador sobre o microscópio óptico invertido (IX51).....	36
Figura 26 - Agulha colocada no braço do motor e pormenor da base da agulha. ....	36
Figura 27 - Painel frontal da caixa electrónica do controlador de comprimento de alta velocidade.....	37
Figura 28 - (A) Resposta sub-amortecida; ajustamento de: (B) R28 para remover overshoot; (C) R25 para remover oscilação de baixa frequência; (D) R59 para remover a oscilação de alta frequência; (E) R28 para remover overshoot; (F) R31 para aumentar a velocidade do sistema. ....	38
Figura 29 - Cabeça do transdutor com fibra de carbono e agulha anexadas. Sentido da força nas medições realizadas – uso em tensão.....	40
Figura 30 - Montagem do transdutor de força para a realização da calibração. ....	40
Figura 31 - Circuito electrónico do transdutor de força, em evidência os potenciómetros de ajuste do <i>offset</i> e do ganho do sistema. ....	41
Figura 32 - Colocação de elásticos, pesos, na agulha do transdutor para registo das tensões durante a calibração. ....	41
Figura 33 - Ilustração do processo de estiramento do cardiomiócito. ....	43
Figura 34 - Sequência contracção-relaxamento esperada para o protocolo experimental usado, com T <sub>max</sub> a tensão máxima de activação da célula, T <sub>t</sub> a tensão total, T <sub>p</sub> a tensão passiva, L <sub>o</sub> o comprimento inicial da célula, ativante: solução com [Ca <sup>2+</sup> ] saturante; e relaxante: solução com baixa [Ca <sup>2+</sup> ]. ....	44
Figura 35 - (A) <i>Setup</i> músculo isolado; (B) local de ligação da parte superior do músculo ao transdutor; (C) local de fixação da base do músculo papilar. ....	48
Figura 36 - (A) Homegeneizador de tecidos e (B) pistão de plástico usados para o isolamento mecânico dos cardiomiócitos.....	50
Figura 37 - Gota com suspensão de células colocada sobre o dispositivo de teste.....	51
Figura 38 – Tensão de saída do transdutor, dada em Volts, para cada peso, em gramas, colocado na agulha durante a calibração, e fatores de calibração obtidos: escala, em mN/V, e offset, em mN. ....	54
Figura 39 - Curva de calibração do transdutor de força (Aurora Scientific Inc., modelo 403A). ....	55
Figura 40 - Imagens representativas de cardiomiócitos colados entre o transdutor de força e o motor. ....	56
Figura 41 - Registo da força e do comprimento durante a realização de um protocolo experimental num cardiomiócito isolado, utilizando uma solução ativante de pCa 4.5. A força é dada em mN e o comprimento é expresso em relação ao comprimento inicial da célula, L <sub>o</sub> . ....	56
Figura 42 - Registo da resposta dos parâmetros de contractilidade e relaxamento em animais controlo e Doxo: ao aumento das concentrações de adiponectina nos parâmetros (A) PS, pico de encurtamento, e (B) tensão ativa, AT; ao aumento das concentrações de insulina após a administração da adiponectina nos (C)	

PS e (D) AT; e ao aumento da concentração da insulina nos (E) PS e (F) AT. Os valores são apresentados pela média±e.p.m., expressos em percentagem de variação em relação ao registo basal. ....	60
Figura 43 - Efeito da distensibilidade à administração de doses crescentes de (A) adiponectina, (B) insulina, após adiponectina, e (C) insulina. Os valores apresentados encontram-se expressos pela média±e.p.m. em percentagem de variação da distensão do músculo em relação aos valores basais. ....	61
Figura 44 - Representação gráfica da tensão passiva (Tp), dada em mN/mm <sup>2</sup> , em função do comprimento do sarcómero (SL), dado em μm. ....	63
Figura 45 - Diferença na rigidez dos cardiomiócitos dos animais controlo e Doxo através do parâmetro Kc. ....	63
Figura 46 - Força isométrica relativa dos cardiomiócitos em função do pCa das soluções activantes, para animais controlo e doxorubicina. ....	64
Figura 47 - Diferenças da sensibilidade ao cálcio entre animais controlo e Doxo através dos parâmetros: (A) pCa <sub>50</sub> e (B) nH. ....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação das especificações do modelo 403A [42]. .....	27
Tabela 2 - Apresentação das especificações do modelo 315C-I [47]. .....	28
Tabela 3 - Peso de Calibração, tensão de saída e fator de escala do transdutor 403A. ....	41
Tabela 4 - Registo dos dados morfológicos dos coelhos: peso do corpo (Pcorpo), peso do coração (Pcoração), comprimento da tíbia (Ctíbia) e rácio entre peso do coração e comprimento da tíbia (Pcoração/Ctíbia)..	57
Tabela 5 - Registo dos parâmetros de contractilidade e relaxamento basais obtidos em protocolos de músculo papilar do ventrículo direito isolado de animais controlo e Doxo. ....	58
Tabela 6 - Registo dos parâmetros obtidos nas medições de força em cardiomiócitos controlo e doxorubicina. Foram obtidos os valores para a tensão total, Tt, tensão passiva, Tp, tensão ativa, Ta, todos expressos em $\text{mN/mm}^2$ , na solução ativante com pCa 4.5. Apresentam-se, também, as relações entre a tensão passiva e a tensão total (Tp/Tt), e entre a tensão passiva e tensão ativa (Tp/Ta). Os valores são apresentados pela média $\pm$ e.p.m. † indica resultado estatisticamente significativo. ....	62

## ABREVIATURAS

Adipo – Adiponectina

ACF – Função de autocorrelação

A/D – Analógico-digital

AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico

ATP - Trifosfato de adenosina

ATPase – Enzima catalisadora de ATP

BDM – 2,3-butanediona

BSA – Soro de bovino

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

DC – Débito cardíaco

Doxo – Doxorrubicina

dL/dtmax – Velocidade de contração

dL/dtmin – Velocidade de relaxamento

dT/dtmax – Velocidade máxima de aumento de tensão

dT/dtmin – Velocidade máxima de queda de tensão

e.p.m. – Erro padrão da média

FE – Fração de ejeção

FFT – Transformada de Fourier

FS – Fração de encurtamento

IC – Insuficiência cardíaca

Ins – Insulina

I/O – Entradas e saídas digitais

IV – Intravenosa

IVS – Espessura do septo intraventricular

Kc – Constante de rigidez

LVDd - Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole

LVDs – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole

LVPw – Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo

LVM – Massa do ventrículo esquerdo

MEC – Matriz extracelular  
nH – Coeficiente de nHill  
PID – Proporcional, integrador, derivativo  
PKA – Proteína cinase depende de AMPc  
PS – Pico de encurtamento máximo  
Relax – Solução de relaxamento  
ROI – Região de interesse  
RS – Retículo sarcoplasmático  
SERCA – ATPase do cálcio do reticulo sarco-endoplasmático  
SL – Comprimento do sarcómero  
Ta – Tensão ativa  
tHR – Tempo para metade do relaxamento  
Tn-C – Troponina C  
Tn-I – Troponina I  
Tn-T – Troponina T  
Tp – Tensão passiva  
tPS – Tempo para o pico de encurtamento  
Tt – Tensão total  
tTa – Tempo para a tensão ativa  
tVR – Tempo para a velocidade de relaxamento  
VD – Ventrículo direito  
Ve – Volume de ejeção  
VE – Ventrículo esquerdo

# 1 INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é um problema que afeta milhões de pessoas em todo o mundo [1], e encontra-se associada a elevadas mortalidade e morbidade [2]. É uma síndrome clínica resultante de uma disfunção aguda ou crónica da função cardíaca caracterizada por uma perfusão inadequada de órgãos vitais, uma atividade neurohumoral exacerbada, retenção de sódio renal e líquidos [3]. A IC é caracterizada por um débito cardíaco diminuído e uma pressão venosa aumentada, geralmente acompanhada de alterações ao nível molecular que levam à morte precoce dos cardiomiócitos, ao aumento da rigidez miocárdica e à degeneração progressiva da função cardíaca [2].

Atualmente a cardiomiopatia dilatada representa o estágio final da IC sistólica e caracteriza-se por um aumento do diâmetro das câmaras ventriculares, e uma consequente redução da contratilidade [4]. Além desta cardiomiopatia existem outras, como a hipertrófica, diagnosticada pelo aumento da espessura do septo intraventricular e da parede do ventrículo, pela exagerada função de bombeamento (elevada contratilidade) e dificuldades no relaxamento e disfunção diastólica [4].

A avaliação da função miocárdica revela-se de extrema importância no diagnóstico destas doenças cardíacas.

Na prática clínica existem, atualmente, várias técnicas que possibilitam avaliar a função miocárdica e a progressão de diferentes cardiomiopatias, como é o caso da eletrocardiografia, ressonância magnética, angiografia e ecocardiografia [5]. Adicionalmente existem outras técnicas laboratoriais que permitem o estudo ao nível do músculo papilar, possibilitando uma avaliação do desempenho mecânico, mas torna-se urgente o desenvolvimento de metodologias que sejam capazes de detetar alterações ao nível celular.

O estudo da função cardíaca em cardiomiócitos isolados tem vindo a assumir um papel fundamental na investigação das alterações fisiopatológicas mecânicas e energéticas que ocorrem a esse nível, conduzindo a uma melhor compreensão de mecanismos e vias de sinalização intracelular do miocárdio. O principal objetivo do estudo em cardiomiócitos isolados é investigar a viabilidade da determinação simultânea de composição de proteínas e propriedades contráteis em biópsias ventriculares de pequeno tamanho. Em particular, é

dada atenção à reprodutibilidade das medidas de força isométrica e à sensibilidade de cálcio em diferentes miócitos da mesma biópsia [6].

## 1.1 OBJETIVOS

O projeto realizado dividiu-se em duas partes. A primeira consistiu na indução de insuficiência cardíaca por cardiomiopatia tóxica induzida pela doxorubicina em coelhos e obtenção de material biológico para posteriores testes. Os objetivos desta parte consistiram em:

- a) Caracterizar a progressão do fenótipo cardíaco associado à cardiomiopatia induzida pela doxorubicina;
- b) Avaliar a função cardíaca em músculos papilares provenientes de coelhos normais e com insuficiência cardíaca;
- c) Determinar os efeitos miocárdicos da adiponectina e da insulina.

A segunda parte baseou-se na implementação de uma nova técnica associada a um equipamento recentemente adquirido pelo Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica<sup>a</sup>. Esta fase teve como objetivos:

- a) Implementar, validar e parametrizar um sistema de medição da força em cardiomiócitos isolados;
- b) Criar um algoritmo de extração de dados, a partir dos ficheiros fornecidos pelo programa de registo e aquisição do sistema de medição de força;
- c) Avaliar a função cardíaca de cardiomiócitos proveniente do material biológico obtido na primeira parte do trabalho;
- d) Organizar e gerir a base de dados associada a este projeto.

## 1.2 CONTRIBUIÇÕES

No estudo realizado com músculos papilares, avaliou-se a função cardíaca de coelhos normais e com insuficiência cardíaca através da utilização de *setups* isotónicos e isométricos.

---

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorácica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Estes *setups* permitiram a aquisição de parâmetros de contractilidade e relaxamento, como: tensão ativa,  $T_a$ , velocidade máxima de elevação da tensão,  $dT/dt_{max}$ ; a velocidade máxima de queda de tensão  $dT/dt_{min}$ ; o pico de encurtamento máximo  $PS$ ; a velocidade de contração,  $dL/dt_{max}$ ; a velocidade máxima de relaxamento  $dL/dt_{min}$ ; o tempo para atingir a velocidade de relaxamento,  $t_{VR}$ ; o tempo de encurtamento máximo,  $t_{PS}$ ; o tempo para atingir a tensão ativa  $t_{Ta}$ ; o tempo para atingir o pico de encurtamento,  $t_{PS}$ ; e o tempo para metade do relaxamento,  $t_{HR}$ .

Para caracterizar o fenótipo associado à cardiomiopatia, recorreu-se a um estudo ecocardiográfico complementar, avaliando-se as dimensões do ventrículo esquerdo e parâmetros como a fração de ejeção (FE) e a massa do ventrículo esquerdo (LVM).

No projeto realizado instalou-se um sistema de medição da força em cardiomiócitos isolados. Este sistema integra um motor magnético com controlo de alta velocidade, um transdutor de força, uma interface analógico-digital, dois braços mecânicos para o controlo da movimentação do sistema, micromanipuladores e um microscópio ótico invertido para a visualização dos procedimentos.

Com o equipamento implementado foi possível obter parâmetros de força das células cardíacas e de sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, controlando o comprimento do sarcómero: a  $T_t$ , força total que o cardiomiócito consegue desenvolver; a  $T_p$ , a força passiva do cardiomiócito; a  $T_a$ , a força ativa que o cardiomiócito desenvolve durante a contração; e o  $pCa_{50}$ , um índice indicador da sensibilidade ao cálcio. Além destes parâmetros, realizou-se o estiramento das células, avaliando-se as suas propriedades passivas. Da relação entre a tensão passiva e o comprimento do sarcómero, obteve-se o valor da constante de rigidez da célula,  $K_c$ .

O programa fornecido com o sistema permitiu criar um protocolo para automatizar o processo de medição de força isométrica, baseando-se no controlo das ações do motor, e ainda a aquisição dos dados.

O estudo realizado com cardiomiócitos provenientes de ápices de corações de coelhos permitiu avaliar a função cardíaca em animais normais e com IC, recorrendo ao sistema implementado.

## 2 MORFOLOGIA CARDÍACA

O coração é um órgão composto por músculo cardíaco responsável por manter o fluxo sanguíneo através de contrações rítmicas e involuntárias [7, 8]. O músculo cardíaco é auto-excitante já que gera contrações espontâneas e rítmicas cuja frequência ou ritmo cardíaco podem ser alterados por influência nervosa ou hormonal [8].

O ciclo cardíaco refere-se ao padrão de repetição da contração, ejeção, relaxamento e enchimento ventriculares. As duas primeiras fases constituem a sístole, e as duas últimas a diástole [9].

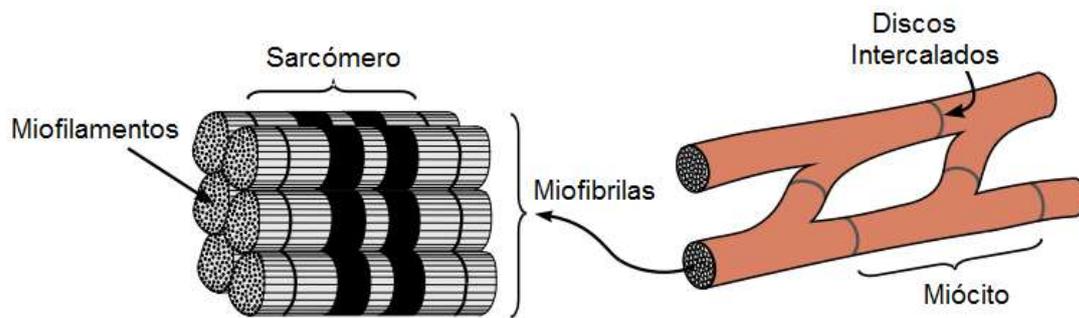
O músculo cardíaco possui características únicas já que é necessário que esteja adaptado à especial função do coração que contrai e relaxa rapidamente. Durante a contração, o coração tem de gerar pressões suficientemente elevadas para conseguir ejetar o sangue para todas as partes do corpo [10, 11].

Neste capítulo abordar-se-á a composição do músculo cardíaco e o seu processo de contração e de relaxamento, bem como a função cardíaca para compreender melhor o coração, já que se revela de extrema importância conhecer a relação entre a sua estrutura e a função dos elementos que o compõe [11]

### 2.1 CARDIOMIÓCITOS

As células musculares cardíacas, os cardiomiócitos, têm forma cilíndrica, cujo diâmetro pode variar entre os 10 e os 25  $\mu\text{m}$ , e o comprimento entre os 30 e os 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente [7]. Para que o fornecimento de oxigénio e substrato seja adequado ao metabolismo cardíaco, o miocárdio possui uma boa rede capilar, com cerca de um capilar por fibra. Além disso, os cardiomiócitos possuem um largo número de mitocôndrias, o que permite suportar os requisitos energéticos, através da síntese de trifosfato de adenosina (ATP) [11].

Estas células possuem um núcleo central e contêm miofibrilas que se organizam em sarcómeros alinhados [10, 11]. Os cardiomiócitos formam redes celulares ramificadas, fortemente unidas topo-a-topo por discos intercalados (ligação mecânica) e comunicando amplamente através junções de hiato, que permitem ligação elétrica entre si (Figura 1) [10-12].

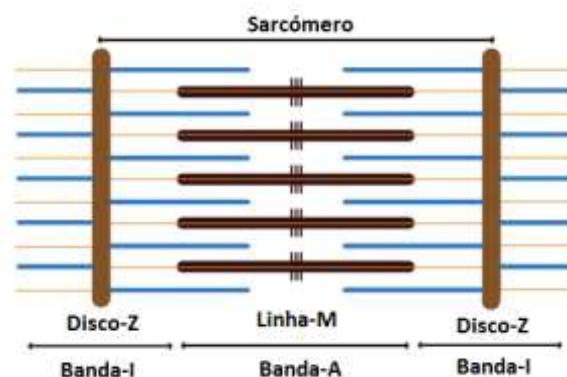


**Figura 1** - Estrutura dos miócitos cardíacos. Os cardiomiócitos são compostos por miofibrilas, cada uma contendo miofilamentos constituídos por actina e miosina. A miosina está ancorada à linha-Z pela titina. O sarcômero, a unidade básica contráctil, situa-se entre duas linhas-Z (Adaptado de [12]).

Os sarcômeros são complexos multi-proteicos que formam unidades básicas responsáveis pela contração dos cardiomiócitos. São compostos principalmente por dois sistemas de filamentos: os filamentos grossos de miosina e os filamentos finos compostos por actina, troponina e tropomiosina [12].

Os sarcômeros são, também, responsáveis pelo aspeto estriado que os cardiomiócitos possuem, e podem ser divididos em 4 áreas microscopicamente distintas: 1) Os discos Z, também designados de linhas-Z, formam o limite de cada sarcômero; 2) a banda-I contém os filamentos de actina e miosina à volta das linhas Z; 3) a banda-A está localizada entre duas bandas I; 4) a linha M forma o centro do sarcômero (Figura 2) [10].

As pontes cruzadas são as interações mecânicas entre os filamentos de actina e miosina durante o processo de contração que provocam o deslizamento dos filamentos finos sobre os grossos, diminuindo a distância entre as linhas-Z e encurtando os cardiomiócitos [10-12].

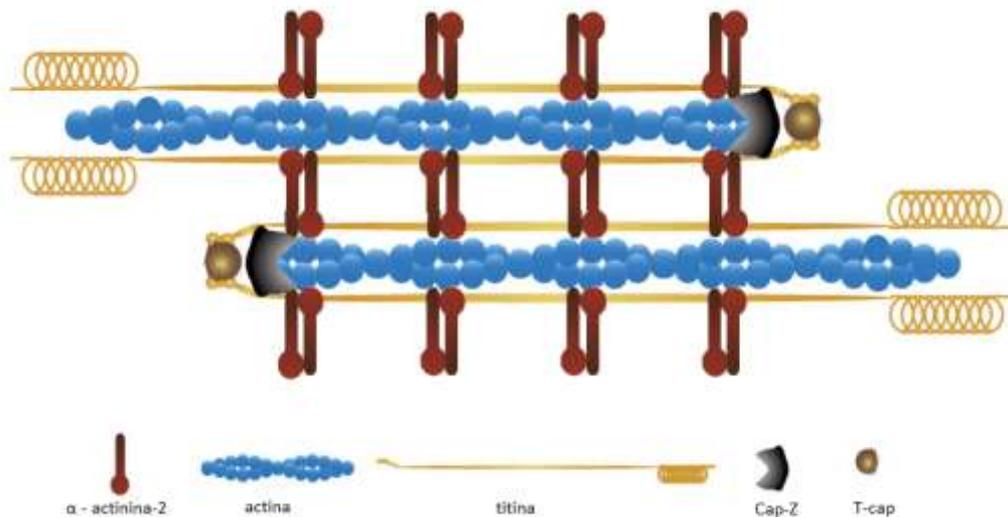


**Figura 2** - Representação esquemática do Sarcômero (Adaptado de [10]).

O comprimento de cada sarcómero é um fator determinante da força de contração do cardiomiócito [12]. Em condições fisiológicas varia entre os 1,6 e os 2,4  $\mu\text{m}$ , sendo a sobreposição dos filamentos de actina e miosina ótima para comprimentos de 2 até 2,4  $\mu\text{m}$ , já que o número de pontes cruzadas formadas e força desenvolvida são máximas [11].

### 2.1.1 PROTEÍNAS MIOFILAMENTARES

A linha-Z tem sido vista, vulgarmente, como uma ligação mecânica entre dois sarcómeros, sendo importante na associação entre os filamentos finos e a transmissão de força gerada pelos miofilamentos. Esta ligação é feita pela  $\alpha$ -actinina, provavelmente o mais conhecido componente dos discos-Z. A  $\alpha$ -actinina é uma molécula de ancoragem dos filamentos finos de actina dos dois sarcómeros à respetiva linha Z que os separa. Os discos-Z podem funcionar como sensores de estiramento altamente especializados (Figura 3) [10].



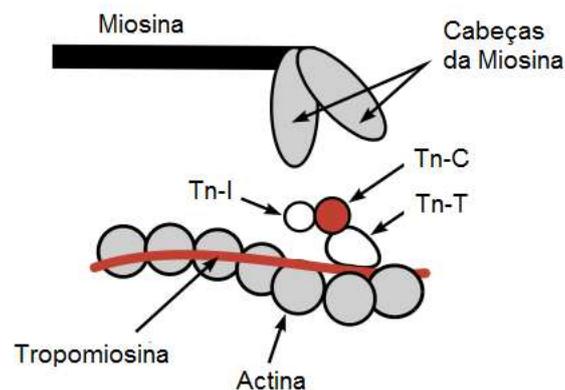
**Figura 3** - Representação esquemática do sensor de estiramento ao nível dos discos-Z (Adaptado de [10]).

No sarcómero existe uma larga proteína filamentosa designada de titina. Esta proteína liga os filamentos de miosina às linhas-Z, posicionando os filamentos grossos no centro do sarcómero. Graças às suas propriedades elásticas, a titina desempenha um papel relevante nas propriedades mecânicas do coração. A titina, a miosina, a actina e outras proteínas, formam o citosqueleto dos miócitos [12].

A miosina é uma proteína de grande peso molecular. Dentro de cada sarcómero, existem cerca de 300 moléculas de miosina por cada filamento grosso. Cada molécula de

miosina contém duas cabeças, que servem como local de ligação à ATPase da miosina, uma enzima que hidrolisa o ATP, necessário à formação de pontes cruzadas. As cabeças da molécula interagem com um sítio de ligação na actina [12].

Cada filamento grosso de miosina está rodeado por seis filamentos finos. Estes filamentos finos são compostos por actina que é uma proteína globular, disposta numa cadeia de unidades globulares repetitivas, formando dois filamentos helicoidais. Entre os filamentos de actina encontram-se proteínas, em forma de bastonete, chamadas tropomiosina. Cada molécula de tropomiosina associa-se a sete moléculas de actina. Anexado à tropomiosina em intervalos regulares está o complexo regulador troponina, composto por três subunidades: a troponina T (Tn-T), que se liga à tropomiosina; a troponina C (Tn-C), que se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$  durante o acoplamento excitação-contração; e a troponina-I (Tn-I), que se liga a actina (Figura 4) [12].



**Figura 4** - Composição dos miofilamentos cardíacos. Os filamentos finos são compostos por moléculas de miosina, cada molécula contendo duas cabeças globulares em cada extremidade. Os filamentos finos são constituídos por actina, tropomiosina, e troponina (troponina-T (Tn-T), troponina-C (Tn-C) e troponina-i (Tn-I) (adaptado de [12]).

O complexo troponina mantém a tropomiosina numa posição que impede das cabeças da miosina à actina. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga à Tn-C, ocorre uma mudança conformacional no complexo troponina de tal forma que o complexo troponina-tropomiosina se afasta e expõe o local de ligação da miosina à actina. Quando o  $\text{Ca}^{2+}$  é removido da Tn-C, o complexo troponina-tropomiosina retoma à sua posição inicial bloqueando a ligação miosina-actina [12].

### 2.1.2 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) é composta por tecido conjuntivo que contém fibras de colágeno I, colágeno III, elastina, substância gelatinosa composta por proteoglicanos e por proteínas da membrana basal como o colágeno IV, a laminina e a fibronectina [13]. Esta MEC atua como um substrato aderente e fornece estabilidade estrutural ao tecido cardíaco [14].

Na periferia da célula, em contato com o disco-Z sarcomérico, existem focos de adesão complexos. Estas estruturas, designadas de costameros, ligam os sarcômeros ao sarcolema. Os costameros são relevantes na transmissão da força contrátil gerada pelas miofibrilas ao sarcolema e à MEC, e eventualmente a células vizinhas [10]. Além disso, são pontos organizacionais do citoesqueleto membranar, que mantêm a integridade estrutural da membrana durante a contração [14].

## 2.2 ESTIRAMENTO

O estiramento significa alongamento do músculo. No coração, o estiramento acontece durante o enchimento. O músculo é então estirado contra uma força de resistência num processo designado de contração excêntrica, enquanto o encurtamento do músculo é designado de contração concêntrica [10].

Os miócitos possuem propriedades elásticas passivas que auxiliam o retorno das células estiradas ao seu comprimento em repouso. No estiramento diastólico, que corresponde a um comprimento de sarcômero do cardiomiócito menor do que  $2,2 \mu\text{m}$ , a geração de tensão diastólica é atribuída principalmente à distensão da titina [13], mas, para comprimentos de sarcômero superiores, a contribuição da matriz extracelular (MEC) torna-se muito importante [10].

## 2.3 EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DA CÉLULA CARDÍACA

O íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é o mensageiro universal envolvido na sinalização intracelular em quase todas as células e tecidos [15] e é essencial na atividade elétrica cardíaca, sendo um ativador direto da contração dos miofilamentos [16].

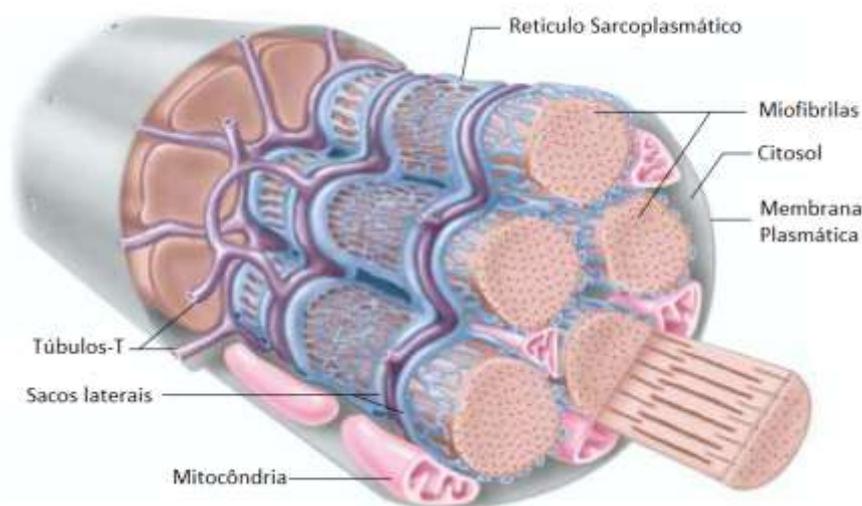
“O ponto crucial no processo contráctil reside na alteração das concentrações de iões de cálcio no citosol miocárdico.” (Opie, 1997)

A modulação da contractilidade e relaxamento cardíacos pelos níveis de cálcio livre intracelular tem sido considerado um mecanismo crucial. Por exemplo, o aumento da força miocárdica que é induzido por hormonas de *stress* (adrenalina e noradrenalina) pode ser atribuído ao aumento da velocidade de entrada de cálcio durante o potencial de ação [15].

A associação excitação-contração cardíaca é um processo que vai desde a excitação elétrica do miócito até à contração do coração [16].

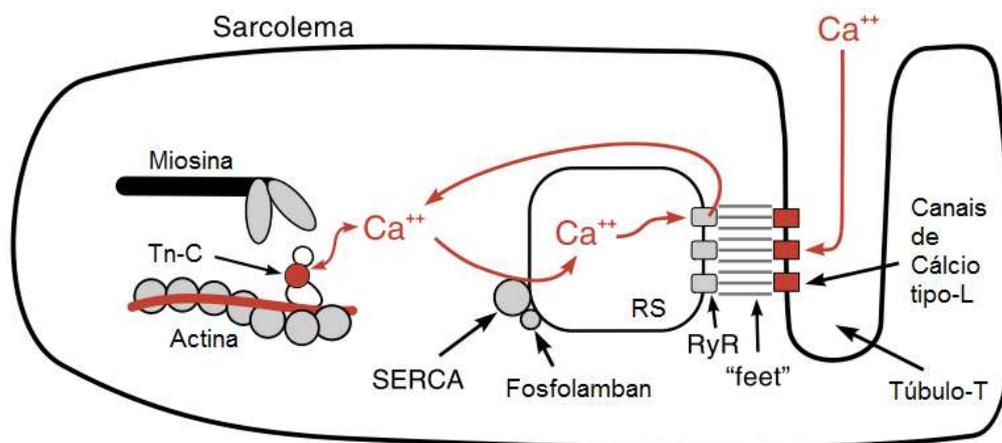
A membrana das células musculares designa-se de sarcolema. Nos cardiomiócitos caracteriza-se por profundas invaginações chamadas de túbulos T (transversais) (Figura 5). Os túbulos T, sendo uma parte do sarcolema, estão abertos para o exterior da célula o que permite as trocas iónicas entre os compartimentos extra e intracelular que são necessárias à despolarização e repolarização elétricas dos miócitos. Dentro da célula, e em estreita associação com os túbulos T, existe uma extensa rede de ramificação tubular chamado retículo sarcoplasmático (RS) [12].

As cisternas terminais são bolsas do RS que estão adjacentes aos túbulos T. Entre as cisternas e os túbulos há regiões de densidade eletrónica, designadas de pés funcionais que detetam a despolarização do sarcolema e permitem a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do meio extracelular através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L [12].



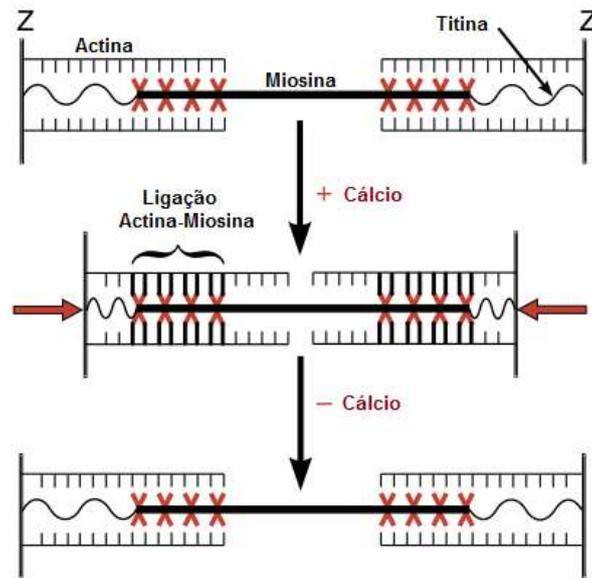
**Figura 5** - Estrutura anatómica dos túbulos transversos e do retículo sarcoplasmático numa fibra muscular (adaptado de 15).

É importante referir que esta quantidade de cálcio é muito pequena. Por si só, este influxo de cálcio não aumenta significativamente a concentração intracelular, exceto nas regiões junto ao sarcolema. Este cálcio é detetado por canais rianodínicos localizados nas cisternas terminais do RS e que se abrem libertando grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma [7, 10, 12]. A combinação do influxo e da libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta a concentração de cálcio livre intracelular, permitindo a sua ligação à proteína Tn-C, que aciona, então, a maquinaria contráctil. Para que ocorra o relaxamento, o  $\text{Ca}^{2+}$  terá que se dissociar da Tn-T e a sua concentração intracelular diminuir substancialmente através da sua recaptação para o interior do RS (Figura 6) [16].



**Figura 6** - Papel do Cálcio no acoplamento excitação-contracção cardíaco (Adaptado de [12]).

No final da sístole, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  cessa, terminando a libertação de cálcio do RS, já que deixa de ser estimulado. Avidamente, o RS retoma o  $\text{Ca}^{2+}$  por meio de uma bomba de cálcio (SERCA-2a – Bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático) que é estimulada pelo fosfolamban, depois deste ser fosforilado por uma proteína cinase dependente do AMPc (PKA) [11]. A fosforilação da troponina-I inibe a ligação do cálcio à troponina-C, o que conduz ao bloqueio dos locais de interação entre a miosina e a actina, ocorrendo o relaxamento. O sarcómero volta ao seu comprimento inicial (Figura 7) [7, 11].



**Figura 7** - Encurtamento do sarcômero e o deslizamento dos filamentos. O cálcio liga-se à troponina-C (Tn-C) possibilitando a ligação actina-miosina, formando as pontes-cruzadas. Removendo o cálcio, inibe-se a ligação actina-miosina e as pontes-cruzadas cessam, voltando o sarcômero ao seu comprimento de relaxamento (Adaptado de [12]).

O desenvolvimento da força de contração depende da concentração intracelular e total de cálcio em relações altamente não-lineares, como resultado de uma forte cooperatividade dos miofilamentos com a respetiva concentração de cálcio. Além disso a contração gera força isométrica (pressão ventricular) e encurtamento rápido (para ejetar o sangue). Existem duas maneiras de alterar a força da contração cardíaca: alterando a amplitude ou a duração dos transientes de cálcio, e alterando a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio [16].

A sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos é melhorada dinamicamente pelo estiramento dos miofilamentos (tal como o coração se enche de sangue), resultando numa contração mais forte. Isto deve-se, em parte, à compressão transversa do miofilamento que ocorre no estiramento, que aumenta a interação actina-miosina. Esta compressão lateral é um importante mecanismo autorregulatório pelo qual o coração se ajusta ao enchimento diastólico alterado [16].

Existem outros mecanismos importantes associados à contractilidade cardíaca. É o caso da alteração da conformidade do cálcio dos miofilamentos. Fisiologicamente, estas variações são obtidas pela alteração do comprimento do sarcômero (mecanismo Frank-

Starling) ou, especificamente, pelo estado da fosforilação das proteínas do miofilamento [15].

O termo “alteração da conformidade do cálcio” refere-se a uma alteração da concentração de cálcio necessária para o desenvolvimento de 50% da força máxima do (modulação sensibilidade ao cálcio), a uma alteração da atividade máxima ou a uma combinação de ambas [15].

## 2.4 FUNÇÃO CARDÍACA

O sistema cardiovascular fornece oxigénio e substratos metabólicos aos tecidos e remove dióxido de carbono e produtos resultante do metabolismo. Isto requer uma integração de todos os seus componentes. As maiores disfunções circulatórias de origem cardíaca devem-se a anomalias do ventrículo esquerdo. Nestes casos, a avaliação clínica da função cardíaca baseia-se no desempenho do ventrículo esquerdo, cuja performance depende da organização e configuração da câmara ventricular, da função valvular e das condições de carga a que está sujeito [17].

A função sistólica cardíaca é determinada por quatro fatores: pré-carga, pós-carga, contractilidade e ritmo cardíaco [17].

A pré-carga é o estiramento do miocárdio antes da contração que determina o comprimento inicial do sarcómero, isto significa que a pré-carga pode ser entendida como a tensão que é realizada sobre o músculo antes do início da contração. Assim, e dentro dos limites fisiológicos, quanto maior for a pré-carga maior forte será a contração do miocárdio [17, 18].

A pós-carga é considerada como a tensão que o miocárdio necessita vencer para contrair, ou seja, é a tensão na parede ventricular que os sarcómeros precisam ultrapassar para encurtarem. Pode ser pensada como a carga que o coração deve exercer para conseguir ejectar o sangue. Deste modo, uma elevada pós-carga origina uma elevada pressão, no entanto o grau e a velocidade de encurtamento diminuem [17].

Em protocolos experimentais que utilizem preparações de músculo cardíaco ou coração isolados, a carga pode sofrer um controlo apertado e os efeitos de intervenções na força, extensão e velocidade de encurtamento indicam os seus efeitos na contractilidade [17]. Assim sendo, a contractilidade, também designada de inotropismo, pode ser descrita

como sendo o desempenho do coração perante determinadas condições de pré e pós-carga. Um índice de contractilidade é a pressão isovolumétrica a um dado comprimento inicial da fibra. Este comportamento reflete a interação que ocorre nas pontes cruzadas. Um aumento da contractilidade pode traduzir-se num aumento da frequência de contração (ritmo cardíaco) ou num aumento da força desenvolvida (efeito inotrópico positivo). Normalmente, no músculo isolado a contractilidade é avaliada através do traçado tensão-ativa – comprimento [11, 17, 18].

### 3 SISTEMAS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CONTRÁCTIL

A avaliação da função contráctil em corações intactos *in vivo* é uma tarefa complexa devido a vários fatores como a pré-carga, pós-carga e frequência cardíaca que são difíceis controlar e podem alterar a contractilidade. Várias estratégias têm sido adotadas para fazer face a estas dificuldades, destacando-se a ecocardiografia e o estudo hemodinâmico [19]. O controlo desses fatores pode ser feito *in vitro* através de preparações multicelulares ou unicelulares.

Neste capítulo descrever-se-ão quatro estudos diferentes que podem ser realizados para avaliar a função cardíaca: o ecocardiográfico, o hemodinâmico, em músculo papilar isolado e em cardiomiócitos isolados.

#### 3.1 ESTUDO ESTRUTURAL E FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICO

A ecocardiografia é uma técnica não-invasiva de ultrassons, desenvolvida para fornecer informações quantitativas sobre o desempenho ventricular pela derivação dos volumes ventriculares e da fração de ejeção a partir das medições do eixo ventricular [20].

A ecocardiografia combina duas modalidades: a imagem dos tecidos e a deteção do fluxo de sangue com a determinação da velocidade (efeito Doppler). A imagem dos tecidos é obtida pela transmissão de ultrassons no tórax, e é o reflexo das estruturas intratorácicas, determinado pelas propriedades acústicas do tecido [21]. Em estudos clínicos, geralmente, utilizam-se as modalidades de imagem bidimensional e o modo-M.

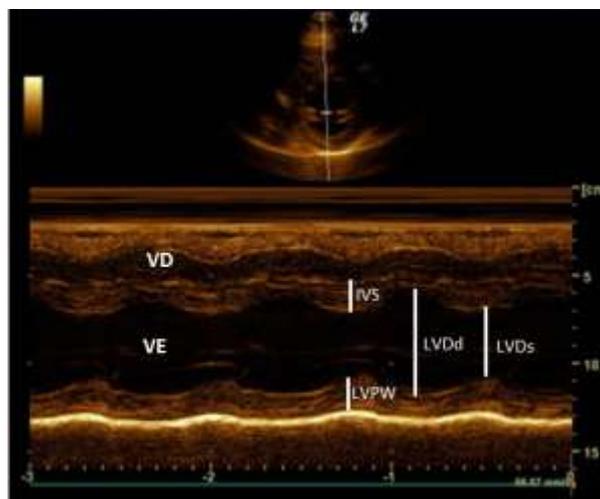


Figura 8 - Ecocardiograma Modo M das cavidades ventriculares direita (VD) e esquerda (VE) [22].

O modo-M usa um único feixe de varrimento para produzir uma vista unidimensional através de estruturas intracardíacas, ao longo da projeção do feixe (Figura 8). O modo-M é útil para medir as dimensões das câmaras cardíacas: a IVS, espessura do septo intraventricular; os LVDD e LVDs, diâmetros do ventrículo esquerdo diastólico e sistólico, respetivamente; e a LVPW, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (Figura 8). O modo-M pode ser utilizado, também, para avaliar o movimento de alta frequência, o que se revela de grande importância para a sequência de eventos, como a abertura e o fecho das válvulas cardíacas. Como o modo-M proporciona um campo de visão muito limitado, é usado, principalmente, como complemento às imagens bidimensionais [21].

As imagens bidimensionais são obtidas a partir de vários feixes de varrimento sequencial gerados e processados eletronicamente, de modo a criar um plano de imagem tomográfica com um campo de visão mais alargado [23].

São necessárias imagens 2D de diferentes projeções para proporcionar uma visão completa do coração. As imagens são, normalmente, obtidas das projeções parasternal, apical, suprasternal e subcostal, manipulando a sonda de modo a obter imagens dos eixos longo e curto de cada estrutura a analisar, tal como mostra a Figura 9 [21].

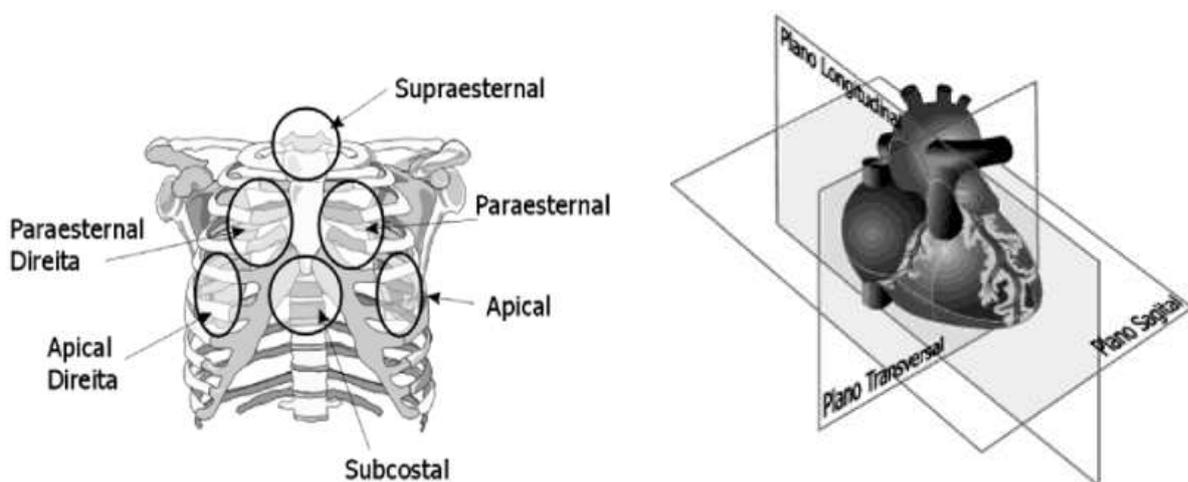


Figura 9 - Janelas e planos ecocardiográficos (Adaptado de [23]).

A fração de ejeção (FE), que é uma medida do desempenho da bomba do coração apenas relacionada com a função mecânica muscular, tem sido amplamente utilizada como um indicador de desempenho do miocárdio sistólico [20].

O recurso a técnicas de Doppler permite comparar velocidades médias de encurtamento circunferencial das fibras. Este parâmetro está relacionado diretamente com a função muscular cardíaca e, portanto, pode fornecer informações sobre o desempenho ventricular que não pode ser obtido considerando apenas a FE [20].

Além de fornecer informações sobre dimensões do VE e FE, ambos importantes para o diagnóstico de insuficiência cardíaca diastólica, a ecocardiografia fornece índices de função diastólica. Os mais conhecidos destes são as velocidades do fluxo mitral: as ondas E e A que correspondem, respetivamente, ao fluxo precoce durante o enchimento precoce do VE e a subsequente contribuição da contração auricular. Quando a função diastólica é normal a velocidade da onda E excede a da onda A [24].

Com relaxamento alterado, a contração auricular contribui relativamente mais para enchimento ventricular ( $A < E$ , com desaceleração prolongada da onda E). Quando aumenta a pressão diastólica do VE, ao ponto que a contribuição da contração auricular é mínima para o enchimento do VE, a onda E mais uma vez torna-se predominante, mas com rápida desaceleração (de alta velocidade da onda E, normalmente mais do dobro da A velocidade da onda) [24].

Esta técnica tem associadas a si algumas vantagens sendo um método de fácil realização, não invasivo e disponível em larga escala, possuindo, no entanto, uma baixa reprodutibilidade, já que é bastante dependente do operador [5]. Além disso, a ecocardiografia não permite a medição de força do músculo cardíaco e, conseqüentemente, não possibilita uma avaliação das suas propriedades mecânicas.

### 3.2 ESTUDO FUNCIONAL HEMODINÂMICO

O estudo hemodinâmico é um método de diagnóstico que utiliza técnicas invasivas para obtenção de dados funcionais e anatómicos das várias cardiopatias. As pressões intracardíaca, arterial e venosa são variáveis importantes e podem ser usadas para avaliar a função cardíaca [17]. As ansas pressão-volume do ventrículo esquerdo, obtidas em tempo real, fornecem um meio de compreensão do mecanismo cardíaco em experiências humanas e animais. Estas ansas podem ser determinadas pela medição da pressão e do volume dentro do ventrículo esquerdo, em tempo real. É através do cateterismo que se faz o estudo

da dinâmica circulatória, que consiste na inserção de cateteres nas cavidades cardíacas [17, 25].

A partir das ansas pressão-volume podem ser determinados vários parâmetros hemodinâmicos relevantes, tais como o volume de ejeção (Ve), débito cardíaco (DC), fração de ejeção (FE), entre outros [24, 25].

Apesar da sua utilidade na obtenção de pressões intracardíacas, o facto de ser uma técnica invasiva e de não permitir medir a força desenvolvida pelo coração torna-se desvantajoso quando se pretende avaliar as propriedades mecânicas deste órgão.

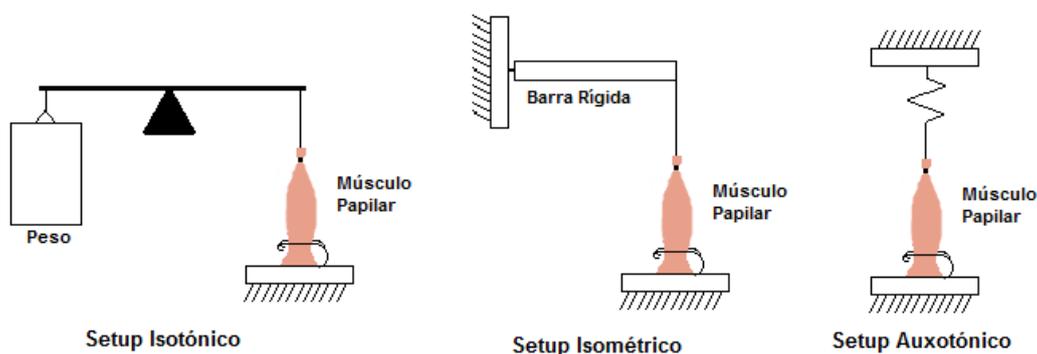
### 3.3 ESTUDOS FUNCIONAIS EM MÚSCULO PAPILAR ISOLADO

A importância funcional dos músculos papilares foi acentuada em 1956, com os estudos de *Rushmer et al.* demonstrando que, na fase inicial da sístole, os papilares promovem encurtamento do eixo longo dos ventrículos, aumentando o diâmetro da base, a tensão nas paredes e, conseqüentemente, a eficácia e ejeção sistólicas [26].

O papel dos músculos papilares do ventrículo esquerdo é, também, fornecer apoio estrutural para a válvula mitral durante a contração cardíaca. Os músculos são particularmente importantes para o fecho da válvula durante a sístole, garantindo que a válvula não se projete para a aurícula [27].

Os estudos realizados com músculos papilares dividem-se, normalmente, em três fases: uma primeira fase isométrica, que ocorre durante a contração isovolumétrica no início da sístole; a fase de encurtamento, que ocorre durante a ejeção (esvaziamento ventricular); e uma fase de re-alongamento que coincide com o enchimento do ventrículo relaxado [27].

Tradicionalmente, estudos cardíacos *in vitro* têm usado o músculo papilar como um modelo de músculo ventricular. Este tipo de protocolos envolvem, geralmente, tanto contrações isométricas como isotónicas com pós-carga, contudo a frequência de contração é muito baixa em comparação com as frequências fisiológicas [27].



**Figura 10** - Diferentes *setups* para determinação da força do músculo papilar.

A preparação com músculo papilar isolado é usada para a avaliação das propriedades mecânicas do tecido cardíaco, tais como efeitos inotrópicos e lusitrópicos, para o estudo das propriedades básicas eletrofisiológicas ou para estudos farmacológicos. A determinação da força mecânica pode ser obtida a partir de três *setups* possíveis (Figura 10): o isotônico (a força mantém-se constante, enquanto o músculo pode encurtar); o isométrico (o comprimento do músculo mantém-se constante, enquanto a força varia); e o auxotônico (a força e o comprimento alteram-se) [28]. No entanto, apenas os *setups* isotônico e isométrico foram utilizados no decorrer deste estudo, já que se pretendia realizar medições isotônicas e isométricas no músculo papilar.

Os músculos papilares necessitam de ser estimulados eletricamente. Desde que a solução usada contenha sais, é possível que os processos eletrolíticos ocorram nos elétrodos, levando à polarização dos elétrodos ou à libertação de metais. Para evitar esta situação, usam-se normalmente elétrodos não polarizáveis (Pt – platina) [28].

Uma das características do músculo cardíaco que o torna difícil para o estudo do ponto de vista mecânico é o facto de as suas propriedades serem influenciadas pelas condições mecânicas sob as quais contrai [29].

### 3.3.1 MEDIÇÕES ISOMÉTRICAS DA FORÇA

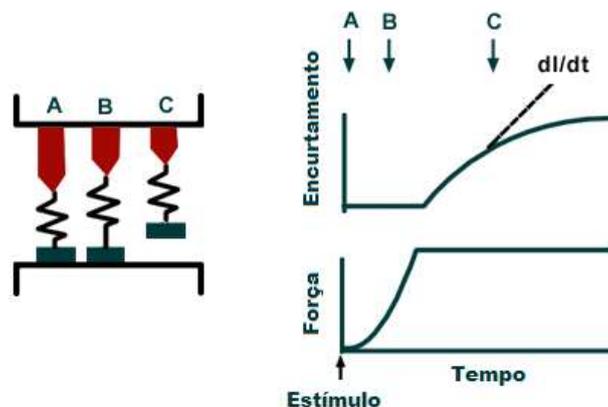
O músculo é colocado no *setup* isométrico, no qual é pré-estirado, e portanto não há alteração do comprimento do músculo quando contrai, isto é, o músculo está fixo nos dois terminais, sendo que um está ligado ao transdutor de força. É então aplicado um estímulo elétrico simples, e a força desenvolvida é registada sob condições isométricas. Os pré-

estiramentos repetem-se. O valor de estiramento no qual se obtém máxima força é definido como  $L_{max}$  [28].

### 3.3.2 MEDIÇÕES ISOTÓNICAS DA FORÇA

Tal como nas medições isométricas, o músculo é fixo na base, enquanto o outro terminal está associado ao transdutor. Em princípio, existe movimento quando o músculo contrai, ao contrário do *setup* isométrico, e este movimento é registado por outro tipo de transdutor [28].

A pré-carga é responsável pela existência do estiramento inicial (Figura 11 A). Com a estimulação, os elementos contrácteis do músculo começam a encurtar, contudo o comprimento não se altera: as fibras musculares encurtam à custa da interação dos miofilamentos. O estiramento dos elementos elásticos representa um aumento progressivo da força desenvolvida, mas sem qualquer encurtamento do músculo. Quando a força dos elementos contrácteis iguala a carga (pós-carga), é possível observar-se um encurtamento do músculo, sem que haja aumento da força desenvolvida [11].



**Figura 11** - Modelo para a contração em pré-carga e pós-carga do músculo papilar, em que A representa o músculo em repouso, B a contração com estiramento sem encurtamento visível, e C a contração com encurtamento externo (Adaptado de [11]).

A velocidade e a força de contração são dependentes da concentração de  $Ca^{2+}$  livre intracelular. A força e a velocidade estão inversamente relacionadas, portanto sem nenhuma carga, a velocidade é máxima, mas a força é insignificante. Numa contração isométrica, sem qualquer encurtamento externo, a força é máxima mas a velocidade é nula [11].

De modo a obter uma relação força-comprimento e a curva isotónica máxima, o músculo é pré-estirado de modo crescente, a força é registada, o estímulo é aplicado [28].

Normalmente é usado um banho cilíndrico com uma resistência exterior para manter a solução a temperaturas fisiológicas. No fundo do banho existe um pequeno dispositivo para oxigenação da solução. O músculo papilar é fixo com a sua base no fundo de uma haste longa, enquanto o tendão é preso ao transdutor de força. Na haste em que o músculo é fixo existe um sensor que permite controlar a temperatura do banho [28].

### 3.4 ESTUDO FUNCIONAL DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

As propriedades passivas e ativas do músculo cardíaco têm sido determinadas pela utilização de aplicações multicelulares, tais como os músculos papilares. Alguns investigadores avançaram para preparações de células únicas isoladas, que permitem que as medições sejam feitas a uma escala mais fina e sem interferência da MEC [30].

O estudo da contractilidade dos cardiomiócitos pode ajudar a desvendar os processos e vias de sinalização intracelulares que estão na base da função cardíaca, quer em corações saudáveis, quer em doentes. São vários os fatores inotrópicos positivos ou negativos que influenciam o comportamento contráctil destas células musculares [31].

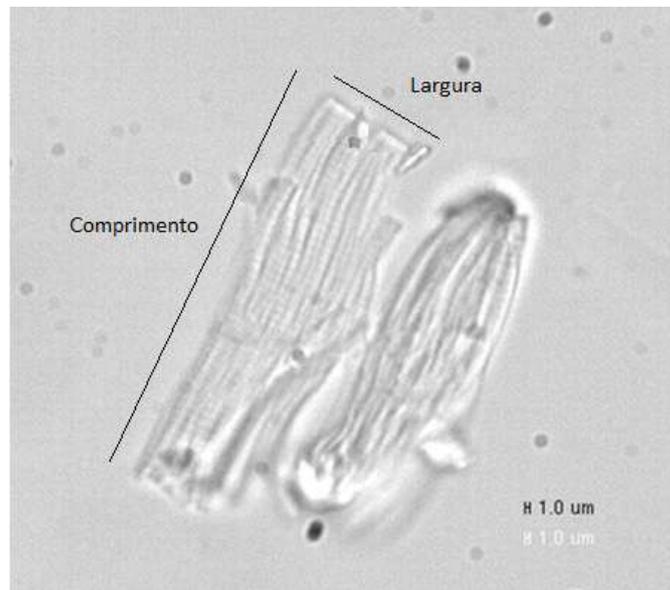
Quando sujeitas a várias condições patológicas, como a sobrecarga de pressão e/ou volume, as proteínas contrácteis sofrem alterações na sua composição, influenciando a função cardíaca [32]. Até agora, os efeitos destas alterações nas propriedades mecânicas e energéticas do coração têm sido investigados em modelos animais [6, 32].

Um dos objetivos do estudo das propriedades mecânicas em miócitos cardíacos isolados é deduzir a cinética das pontes cruzadas pela compreensão do processo contráctil [33].

A função contráctil está fortemente dependente do comprimento do sarcómero e do encurtamento das pontes-cruzadas [33]. Uma preparação de cardiomiócitos isolados torna-se importante para o estudo da mecânica cardíaca devido à ausência de tecido conectivo e endotélio que provocam alterações nas propriedades contrácteis e viscoelásticas do tecido [34]. De facto, uma preparação sem colagénio e com um número reduzido de miofibrilas

permite um acesso quase direto à medição do comprimento do sarcómero e à resposta contráctil das pontes-cruzadas [33].

Os mecanismos subcelulares podem ser avaliados com maior detalhe neste tipo de preparações, o que é uma vantagem em relação a preparações de tecido intacto, como é o caso do músculo papilar isolado [34].



**Figura 12** - Cardiomiócitos isolados (escala em  $\mu\text{m}$ ).

A escolha da célula é importante: deve ser tido em conta o seu aspeto estriado, que permitirá determinar o comprimento do sarcómero, e as dimensões próximas das esperadas (largura cerca de  $25 \mu\text{m}$  e comprimento próximo dos  $100 \mu\text{m}$ ). A Figura 12 mostra uma célula dentro dos parâmetros desejáveis para a colagem.

A fixação de um cardiomiócito possibilita a medição da sua força e da sua rigidez [33]. O desenvolvimento de técnicas que possibilitam a medição de força em células não tem sofrido um grande progresso. A dificuldade de encontrar métodos de fixação de células que sejam suficientemente robustos para tolerar contrações fortes sem afetar a função da célula e a sua viabilidade estão na base deste impasse.

Em 1989, *Le Guennec et al.* apresentaram uma técnica que permitia controlar a pré-carga do cardiomiócito fixando fibras de carbono nas extremidades da célula. Deste modo era possível aumentar o comprimento do sarcómero (SL) homoganeamente e calcular as forças passiva e ativa pela monitorização ótica das alterações na curvatura das fibras de carbono [35]. Esta técnica tem sido utilizada por vários grupos de investigação para a caracterização das propriedades eletromecânicas durante contrações auxotónicas [34].

Recentemente, *Yasuda et al.* utilizaram uma versão modificada da técnica de *Le Guennec*, adaptando um sistema de controlo de força e comprimento. Este método pode ser usado em cardiomiócitos isolados durante contrações isométricas, isotónicas, e auxotónicas. Uma fibra de carbono é rígida, servindo como local de ancoragem da célula, enquanto o movimento de flexão da fibra complacente é controlado para fazer a medição da força e do comprimento. Uma desvantagem desta técnica é a ausência de controlo da posição global do cardiomiócito, o que contribui para a indefinição do sarcómero [34, 36].

Vários investigadores têm apontado um método que recorre a um transdutor de força sensível e um motor para medição de força em cardiomiócitos isolados durante contrações isométricas. Neste processo a fixação ao transdutor e ao motor é realizada com cola silicone, sendo que o motor realizará alterações no comprimento das células [6, 37-39]. Um estudo realizado por *van der Velden et al.* em cardiomiócitos provenientes de biópsias humanas revela que a força isométrica média na concentração de saturação de cálcio ronda os 50 N/mm<sup>2</sup> [6].

Outras técnicas têm sido desenvolvidas para substituir a utilização de transdutores de força. A ligação física do transdutor à superfície da célula pode contribuir para a força medida, provocando erros de medição [40]. É o caso do método proposto por *Lin et al.*, baseado em tecnologia de sistemas microeletromecânicos (MEMS). Com esta tecnologia, fabricaram dois feixes transdutores, incorporando um dos feixes um medidor de tensão. As extremidades dos cardiomiócitos estão ligadas aos feixes por braçadeiras [39, 41]

Outra técnica de avaliação da contractilidade dos cardiomiócitos, e que utiliza um grânulo magnético, foi proposta por *Yin et al.*. O grânulo é anexado a uma extremidade celular, e é aplicado um campo magnético sobre ele. Recorrendo a um microscópio invertido com deteção de bordas, a força contráctil pode ser extraída da medição do deslocamento máximo de contração celular e da força do campo magnético de carga no grânulo [39, 40].

O sistema implementado, e que será apresentado de seguida, é constituído por um transdutor de força e um motor magnético. A escolha deste tipo de sistema, em detrimento de outros já existentes, baseou-se nos parâmetros de força isométrica pretendidos e no facto deste sistema proporcionar um ajuste uniforme do SL.

## 4 IMPLEMENTAÇÃO DE SISTEMA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

A avaliação da função cardíaca a nível celular torna-se cada vez mais relevante na compreensão do processo contráctil, pela alteração das propriedades mecânicas e energéticas dos cardiomiócitos.

Como explicado no capítulo anterior, a aquisição dos valores de força de um cardiomiócito é a base desta avaliação funcional. Para tal, é necessário um sistema que proporcione a fixação dessas células e que permita a medição da sua força e o controlo o seu comprimento.

Neste capítulo descrever-se-á o funcionamento do sistema que possibilita efetuar estas tarefas em cardiomiócitos, bem como a sua implementação e parametrização. Abordar-se-á, ainda, o modo como foram adquiridos e tratados os dados fornecidos pelo sistema durante a medição de força.

### 4.1 SISTEMA DE MEDIÇÃO DE FORÇA

O sistema para avaliar funcionalmente os cardiomiócitos consiste num conjunto de dispositivos mecânicos e eletrónicos que, em conjunto, permitem o controlo e a aquisição de parâmetros funcionais das células em questão. O diagrama de blocos do *setup* para a medição de força está representado na figura seguinte (Figura 13).

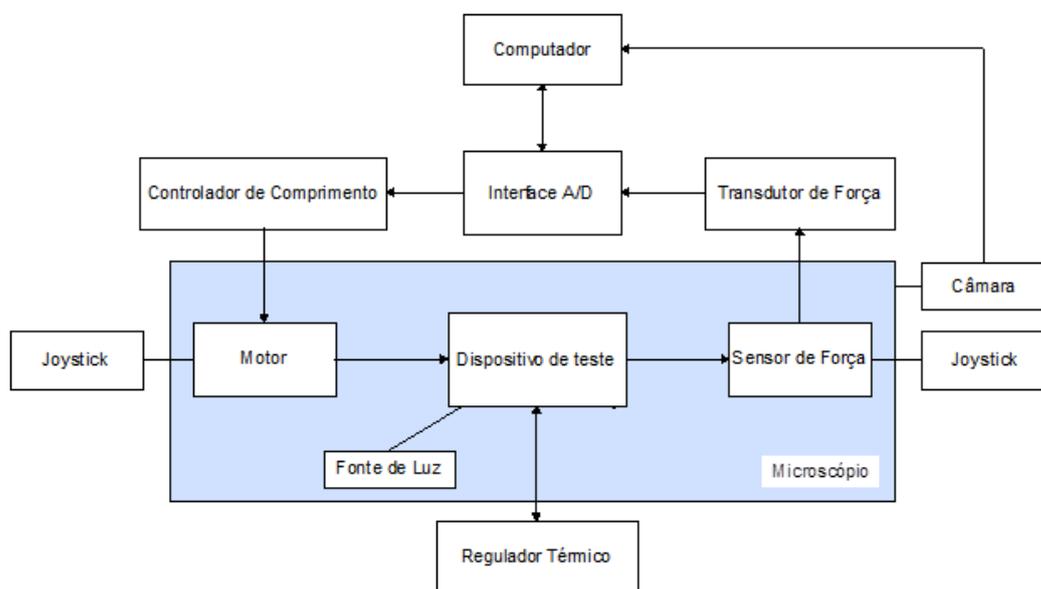


Figura 13 - Representação em diagrama de blocos dos vários componentes que compõe o *setup*.

Este sistema é composto por um transdutor de força, um motor com controlador servo, um microscópio ótico invertido e um termorregulador. Além destes dispositivos, possui também micromanipuladores (joysticks), uma câmara de vídeo e uma interface A/D, que converte os sinais analógicos provenientes do transdutor em sinais digitais.

#### 4.1.1 TRANSDUTOR DE FORÇA

O sistema transdutor de força utilizado foi o Modelo 403A fornecido pela Aurora Scientific Inc., e baseia-se num condensador de placas paralelas, de deslocamento variável. A sua representação esquemática é apresentada na Figura 14.

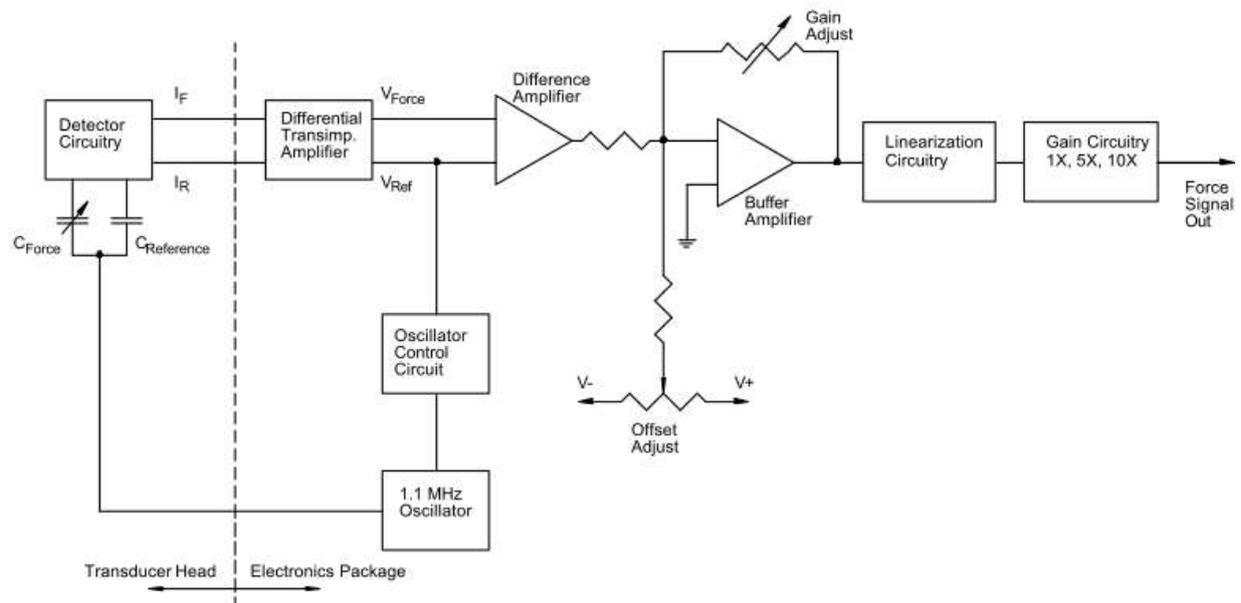


Figura 14 - Representação esquemática do transdutor de força [42].

Os transdutores capacitivos são os mais difundidos nas medições de força. Estes transdutores são muito precisos, e são conhecidos por possuírem sensibilidade e resolução extremamente elevadas, por uma grande largura de banda, pela sua robustez, estabilidade e capacidade de medições sem grandes flutuações [43, 44]. Podem ser utilizados em ambientes hostis (alta temperatura, compôs magnéticos, radiação) [22, 43].

A base de qualquer sensor capacitivo é um condensador. Os condensadores estão disponíveis em três configurações, ilustradas na Figura 15: plana (paralela), cilíndrica (coaxial) e esférica (concêntrica) [43].

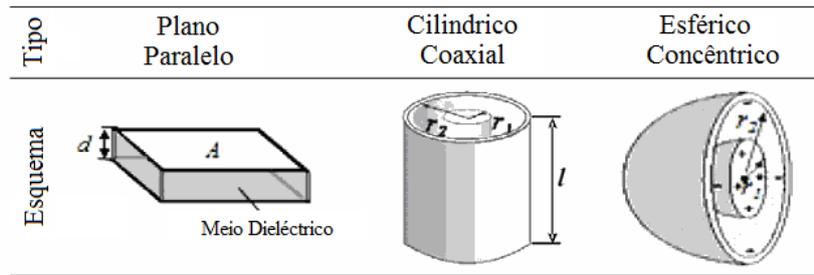


Figura 15 - Principais tipos de condensadores capacitivos (adaptado de [43]).

No sensor de força, as duas placas estão separadas por ar, ou outro meio dielétrico. A capacidade aos terminais do condensador  $C$  é dada por:

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d}$$

em que  $C$  é a capacidade (em farads – F),  $\epsilon_r$  a constante dielétrica do espaço entre as placas,  $\epsilon_0$  a constante dielétrica relativa do isolante,  $A$  a área sobreponível das duas placas e  $d$  a espessura do espaço entre as placas [22, 45].

A medição da força é feita através do condensador  $C_{\text{Force}}$  (Figura 14). A força é direcionada para uma membrana cuja deflexão elástica é detetada pela variação da capacidade, dada a variação da distância entre as duas placas deste condensador [22]. O valor do condensador  $C_{\text{Reference}}$  (Figura 14) serve como referência, sendo que a diferença entre as capacidades de ambos os condensadores dará o valor de força medida. Esta força será proporcional à diferença entre as duas capacidades [45]. Um circuito eletrônico converte as variações de capacidade em variações de tensão [22].

A capacidade descreve a resposta à aplicação de diferentes voltagens num condensador, e é uma grandeza determinada pela quantidade de energia elétrica que pode ser armazenada por uma dada tensão e pela quantidade de corrente que o atravessa numa certa frequência [46]. A capacidade pode ser expressa por:

$$C = \frac{q}{U}$$

onde  $q$  é a quantidade de carga, dada em Coulomb, e  $U$  é o potencial electrostático, dado em Volts [46].

Este é um sistema muito sensível a interferências térmicas, mecânicas e elétricas, que podem alterar o valor de capacidade dos condensadores. Como ambos os condensadores

estão sujeitos às mesmas condições, a subtração dos valores dos dois dispositivos anulam qualquer efeito adverso, tornando este sistema termicamente estável [42].

Uma das maiores vantagens destes transdutores é que o movimento de uma das suas placas relativamente à outra requer a aplicação de forças extremamente pequenas, detetando variações muito pequenas com muita precisão [22].

O circuito detetor, apresentado na Figura 14, que se encontra no transdutor, converte a corrente alternada de alta frequência num sinal de corrente contínua proporcional ao valor de cada condensador. O sinal é então enviado para o sistema eletrónico onde um amplificador diferencial de transimpedância converte os sinais de corrente em tensões proporcionais. Um amplificador diferencial gera a diferença entre estes dois sinais e o sinal resultante passa através de um amplificador *buffer*, usado também para fornecer controlo de *offsets* e da amplitude do fator de escala [42].

Antes de passar para o amplificador diferencial, o sinal do condensador de referência é usado para acionar o circuito de controlo oscilador. Se, por exemplo, uma mudança de temperatura no transdutor aumenta a corrente através do condensador de referência, isso reflete-se no sinal que atravessa este circuito. Então, deve diminuir a amplitude do oscilador o suficiente para dar conta da variação térmica. A resposta em frequência do circuito oscilador é, também, suficientemente elevada para acomodar as alterações devido às vibrações mecânicas, distúrbios da linha de alimentação, etc., e é responsável por uma melhoria de pelo menos 40 dB do ruído do sinal [42].

Após o sinal ter passado pela desmodulação e pela rede de controlo, deve ser linearizado. Isto deve-se ao facto de que a variação da capacidade em função da lacuna (espaço entre as placas do condensador) ser não-linear. Na verdade, deve ser aplicada uma função de correção diferente para as forças positivas e negativas, desde que a capacidade varie em função da distância  $d$ . É utilizada uma aproximação linear por partes através de uma rede de 4 díodos, que melhora os típicos 10% da não linearidade em larga escala para menos de 1% [42].

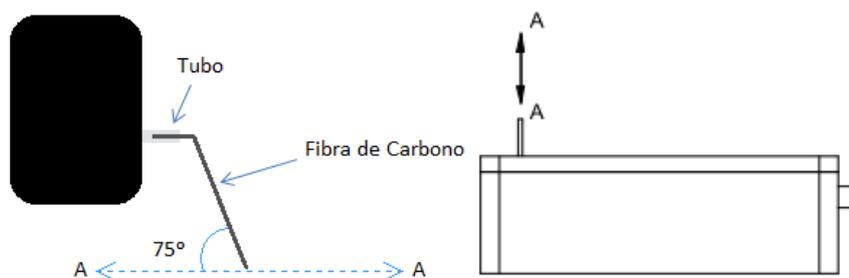
O sinal passa, ainda, por um circuito de ganho antes de sair para o conector BNC no painel frontal. Um comutador permite que o operador escolha um ganho de 1X, 5x ou 10x. O sinal de saída é enviado simultaneamente para um voltímetro digital no painel frontal que exhibe a corrente de saída do dispositivo [42].

Na tabela que se segue (Tabela 1), apresentam-se todos os valores, e respetivas unidades de medida, das especificações do transdutor de força 403A, nas quais se baseou a escolha deste transdutor.

**Tabela 1** - Apresentação das especificações do modelo 403A [42].

Especificações	Modelo 403A
Escala Total [+/- mN]	5
Sensibilidade [mN/V]	0.5
Resolução [ $\mu$ N]	0.1
Tempo de Resposta [ms]	1.0
Frequência de Ressonância [Hz]	600
Complacência [ $\mu$ /mN]	1.0
Varição do offset [ $\mu$ N/ $^{\circ}$ C]	0.5
Varição do ganho [%/ $^{\circ}$ C]	0.01
Histerese [%]	0.01
Força Máxima de Sobrecarga [mN]	100
Comprimento do Tubo [mm] (L)	7.0
Diâmetro do Tubo [mm] (D)	1.0

A Figura 16 mostra uma imagem ilustrativa do transdutor de força. O tubo de saída do dispositivo é composto por vidro de borossilicato e a carcaça envolvente é de alumínio, o que torna o dispositivo um bom escudo eletrostático. Ao tubo de vidro do transdutor de força foi adicionado uma fibra fina de carbono (com cerca de 1,5 cm), fazendo um ângulo de cerca de  $75^{\circ}$  com o eixo AA, o que permite reduzir o efeito da tensão de superfície no valor de saída do transdutor de força [38].

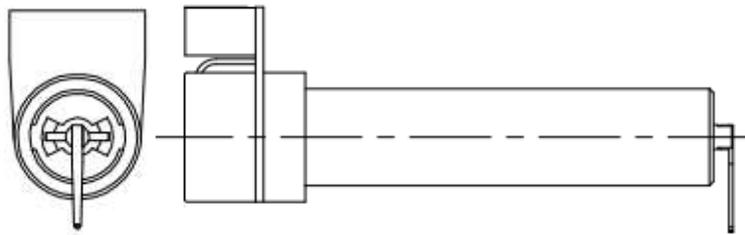


**Figura 16** - Representação do transdutor de força e do eixo de atuação da força (eixo AA).

Ao transdutor foi adicionada uma fibra de carbono, cujo ângulo feito com o eixo de aplicação da força (Figura 16)

#### 4.1.2 CONTROLADOR DE COMPRIMENTO

O controlador de comprimento de alta velocidade (Aurora Scientific Inc., Modelo 315C-I) foi desenhado para estudos fisiológicos de características mecânicas dos tecidos musculares (Figura 17) [47].



**Figura 17** - Representação do Controlador de comprimento de alta velocidade [47].

O coração do controlador é um motor de movimento rotativo magnético. O rotor destes dispositivos é um ímã suspenso em rolamentos esféricos de precisão. O rolamento está localizado logo atrás da frente do motor, onde sai o eixo [47].

Na tabela que se segue (Tabela 2), apresentam-se as especificações do controlador de comprimento de alta velocidade 315C-I.

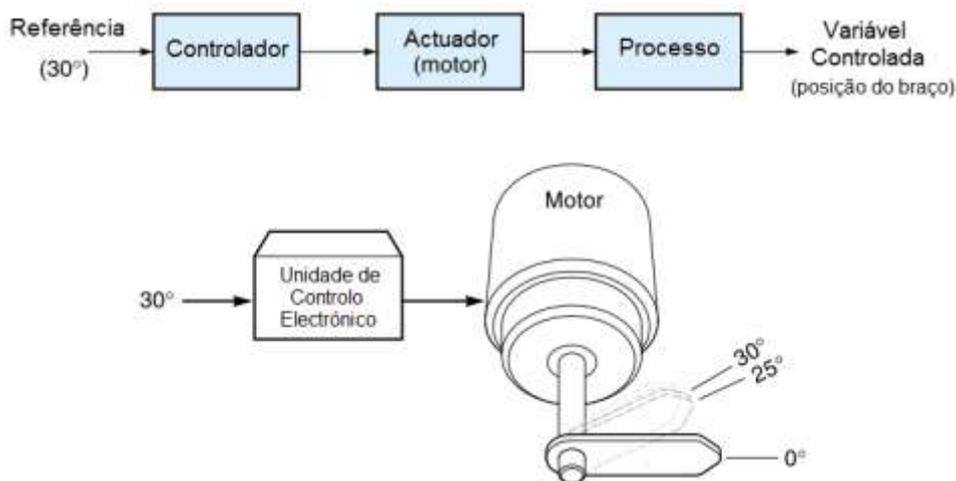
**Tabela 2** - Apresentação das especificações do modelo 315C-I [47].

Especificações	Modelo 315C-I
Comprimento de Excursão [mm]	3
Comprimento do braço [mm]	11
Resolução [ $\mu\text{m}$ ]	0.5
Linearidade [%]	99.5
Factor de Escala [mm/V $\pm$ 10%]	0.15
Tempo de Resposta ao Degrau [ms]	500 (150 $\mu\text{m}$ de degrau) *
Resposta Sinusoidal [kHz]	1.2 (-3dB)
Força Isométrica Máxima [mN]	50
Complacência Isométrica [ $\mu\text{m}/\text{mN}$ ]	<0.01

\* 1% a 99% criticamente amortecida

Todos os sistemas de controlo têm, pelo menos, um controlador e um atuador (também chamado de elemento de controlo final). Como se mostra no diagrama de blocos da Figura 18, o controlador é a inteligência do sistema e geralmente é eletrónico. A entrada do controlador é chamada de variável de referência, que é um sinal que representa a saída do sistema desejada. O atuador é um dispositivo eletromecânico que leva o sinal do controlador e converte-o numa ação física que, no caso específico, é um motor [48, 49].

O último bloco é rotulado de processo e tem como saída a variável controlada. O processo representa o sistema físico a ser afetado pelo atuador, e a variável controlada é o resultado mensurável desse sistema. No caso do motor (atuador) que possui um braço giratório, por exemplo, o processo é "rotação do braço", e a variável controlada é a "posição angular" do mesmo [48].

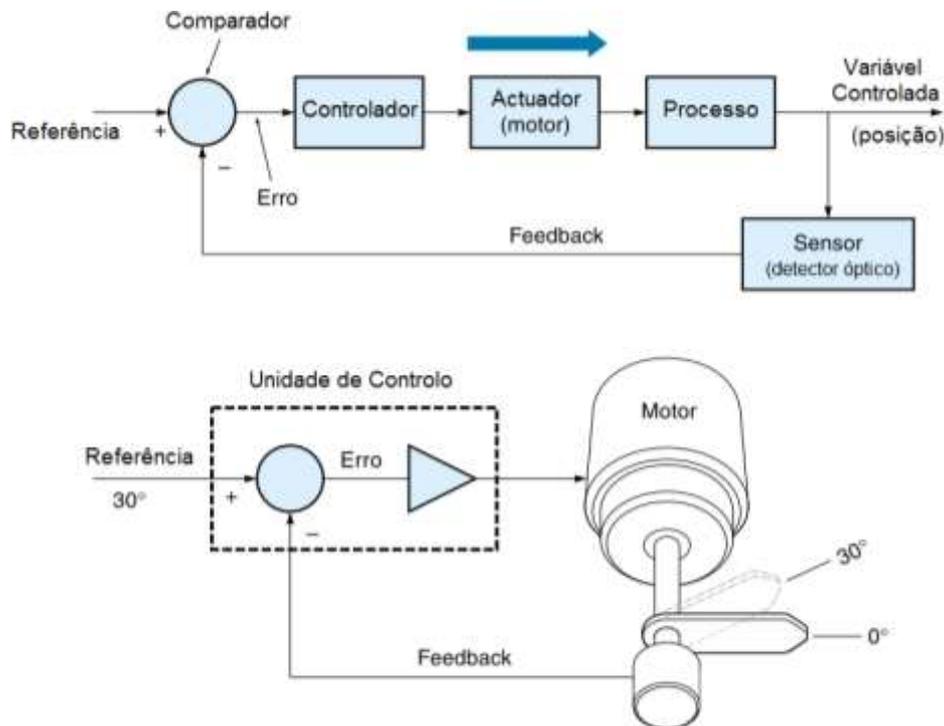


**Figura 18** - Diagrama de blocos de um controlador em malha aberta, e representação esquemática da atuação de um motor quando, por exemplo, se dá ordem para girar 30° (Adaptado de [48]).

Num controlo de malha aberta, como na Figura 18, o controlador calcula a voltagem exata necessária para mover o braço. No entanto, o motor não sabe se realmente o atuador realizou a ação correta, dado não haver nenhuma realimentação [48, 49].

Num sistema de malha fechada, a saída do controlador (variável controlada) é monitorizada constantemente por um sensor. O sensor extrai amostras à saída do sistema e converte essas medidas num sinal elétrico, que volta para o controlador (realimentação). Por comparação com a variável de referência, o controlador sabe a ação que o atuador realizou, podendo fazer os ajustes necessários para manter a saída desejada (Figura 19) [48].

No modelo 315C-I, o sensor que monitoriza a ação do motor é um detetor ótico de posição de elevado desempenho. Localiza-se na parte traseira do motor e deteta as alterações de comprimento na extremidade do braço. O sistema possui ainda um stop mecânico dentro do motor para prevenir movimentos brutos [47].



**Figura 19** - Diagrama de blocos de um controlo em malha fechada, onde existe realimentação, e representação da atuação do motor com unidade de controlo (adaptado de [48]).

O controlo *on-off* é dos mais usados e o sistema de controlo mais simples. Neste tipo de sistema, a variável de comando apenas pode assumir dois valores: on (máximo) e off (mínimo). Assumirá o valor máximo se a variável controlada for maior que o limite inferior, e o valor mínimo se for menor do que o limite superior (Figura 20 A) [50].

A maior desvantagem do controlo *on-off* é a oscilação persistente em torno do valor de referência (Figura 20 B) [50]. A zona entre os limites mínimo e máximo da variável controlada é designada de zona de histerese. A histerese destina-se a impedir o desgaste e o aumento das perdas de energia numa operação, associados à oscilação em torno do valor de referência. A largura da margem de histerese, é ajustável de modo a encontrar um equilíbrio entre a frequência de comutação do atuador e a precisão de regulação [48].

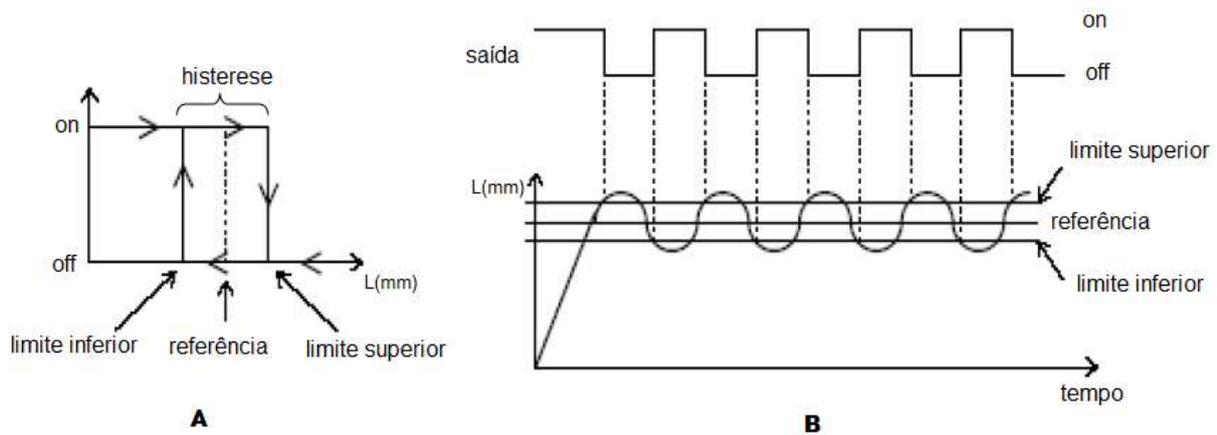


Figura 20 - Esquemática do controlo on-off.

A aplicação da lei de controlo PID consiste no somatório de três ações controladoras: a ação proporcional (P), a ação integral (I) e a ação derivativa (D) [50].

A ação proporcional (P) do controlador origina uma redução do erro em regime permanente, dado que há uma maior tendência para a oscilação. Esta tendência deve-se ao facto de existir uma banda proporcional onde é realizado o controlo (Figura 21) [50].

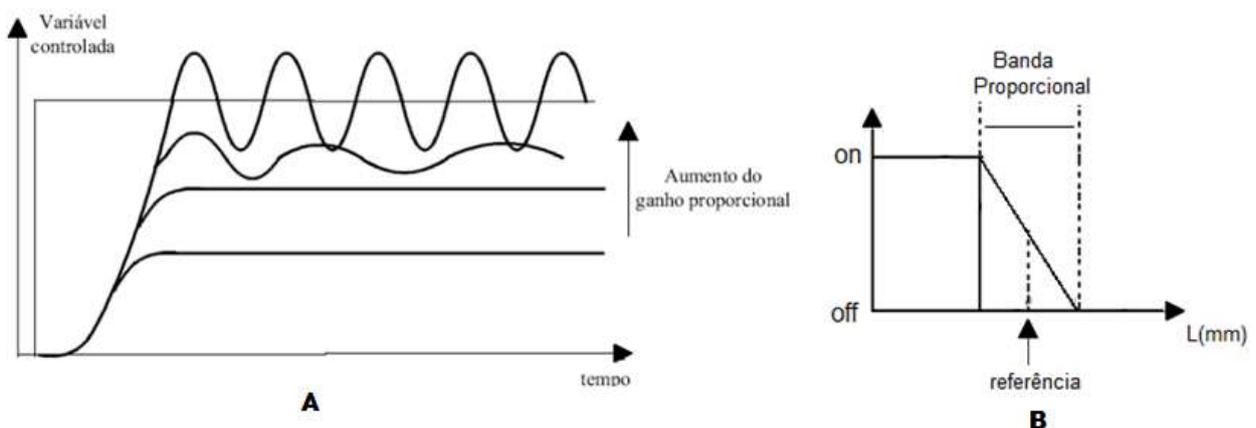


Figura 21 - Esquemática do controlo proporcional.

Em relação ao controlador *on-off*, um controlador proporcional tem a vantagem de proporcionar uma variável de controlo pequena quando o erro é pequeno e, portanto, evita esforços excessivos de controlo. A principal desvantagem do uso de um controlador proporcional puro é que produz um erro de estado estacionário. Com o aumento do ganho

proporcional consegue-se diminuir o erro em regime permanente mas a oscilação será maior. O aumento do ganho pode levar o sistema à instabilidade [49, 50].

O uso de uma ação proporcional em conjunto a uma ação integral (PI) resolve os principais problemas da resposta oscilatória associados a um controlador *on-off* e do erro de estado estacionário associado a um controlador proporcional puro [50].

Diminuindo o tempo integral ( $T_i$ ) verifica-se uma maior tendência para o sistema oscilar. Aumentando  $T_i$  consegue-se um aumento na estabilidade do processo (Figura 22).

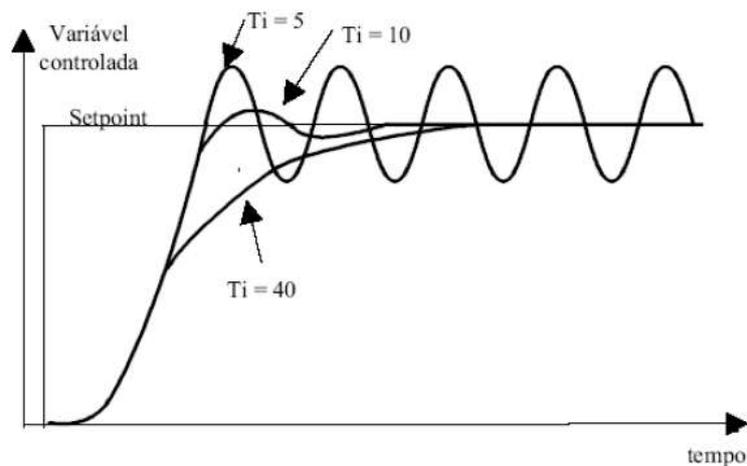


Figura 22 - Esquematização do controle integral.

A ação derivativa tem um efeito de antecipar a resposta, dado que se baseia no cálculo da derivada do erro, atenuando normalmente o efeito oscilatório introduzido pela ação integral. Em grande parte, a ação derivativa melhora a resposta do sistema. Contudo, evita-se a sua aplicação em processos que apresentem muito ruído [49, 50].

#### 4.1.3 INTERFACE ANALÓGICO-DIGITAL

Para converter os sinais analógicos em digitais, e vice-versa, requer-se uma interface analógico-digital (A/D). A interface A/D, utilizada para a implementação do equipamento de medição em cardiomiócitos isolados, possui uma resolução que permite medir a força e controlar o comprimento com a resolução do transdutor e do controlador, respetivamente. A sua resolução é de 16bits nas 8 entradas diferenciais A/D e nas 2 saídas D/A que possui. A

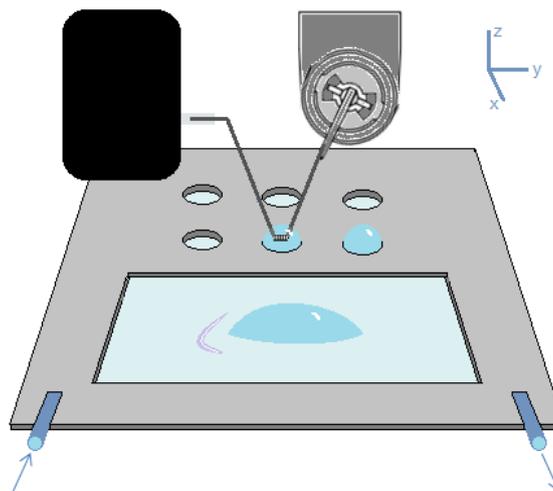
frequência de amostragem máxima nas entradas e saídas analógicas é de 200 KHz e todas aceitam sinais analógicos entre os -10V e os +10V [51].

A ligação das portas da interface com o equipamento é feita através de cabos BNC. As 8 entradas A/D que possui permitem a ligação das portas “Length-In” e “Force-In” do controlador de comprimento e do transdutor, sendo as outras entradas auxiliares., enquanto as 2 saídas D/A servem para o controlo do comprimento (“Length-Out”) e da força, no caso de existir. Possui ainda entradas e saídas digitais (I/O) para a ligação, por exemplo, de estimuladores, se necessário [51].

#### 4.1.4 DISPOSITIVO DE TESTE

O dispositivo de teste consiste numa placa de alumínio, que possui 6 poços com fundo de vidro. A placa também inclui uma área localizada à frente dos 6 poços, que serve de local de montagem das células. Neste pode ser colocada uma lâmina de microscópio com dimensões 3” x 1” x 1 mm. A superfície superior da lâmina fica nivelada com a superfície da placa, para possibilitar a fácil transferência de cardiomiócitos do local de montagem para os poços.

A placa é fixa à superfície do microscópio por 4 parafusos, e a deslocação das células para cada banho é feita pelo movimento de translação XY do microscópio. A placa funciona como um banho, cuja temperatura é regulada por um termorregulador.



**Figura 23** - Representação Esquemática do dispositivo de Teste, com a entrada e a saída de água proveniente do regulador térmico.

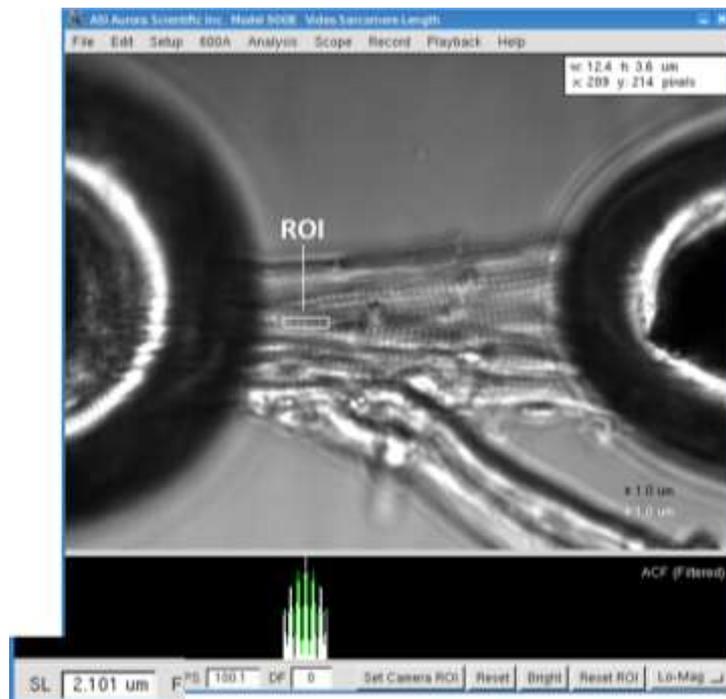
#### 4.1.5 MICROMANIPULADORES

O equipamento que suporta o transdutor e o controlador é provido de manipuladores, possibilitando o movimento de ambos os dispositivos de um modo grosseiro. Os micromanipuladores manuais (Marzhuser Wetzlar HS 6 - manuell) que possui são robustos e são projetados para aplicações que requerem grande precisão, como é o caso, em que se manipula células cujo tamanho se situa na ordem dos micrómetros.

A associação de joysticks (Marzhuser Wetzlar STM3) aos micromanipuladores manuais proporciona a execução translações simultâneas nos eixos X, Y e Z, em múltiplas direções. O deslocamento máximo nos três eixos é de 25 mm, e a utilização dos joysticks confere uma resolução de cerca de 0,01  $\mu\text{m}$  ao sistema de manipulação.

#### 4.1.6 SISTEMA DE VISUALIZAÇÃO

A câmara de vídeo instalada, anexada ao microscópio, possibilita a obtenção de imagens em tempo real. Em conjugação com o programa VSL 900B (Aurora Scientific Inc.) permitiu determinar as dimensões dos cardiomiócitos, em  $\mu\text{m}$  ou em pixéis, bem como o controlo do SL, através da seleção de uma região de interesse (ROI) da imagem (Figura 24).



**Figura 24** - Seleção de uma região de interesse (ROI) e cálculo do comprimento do sarcómero (SL) a partir do gráfico ACF da região de interesse.

O comprimento do sarcômero é um parâmetro importante para a geração máxima de força pelos cardiomiócitos. Microscopicamente, as linhas-Z formam um padrão de estriação evidente que permite calcular a distância entre os sucessivos picos de intensidade máxima e a determinação do comprimento dos sarcômeros.

O programa VSL 900B inclui três métodos para calcular o comprimento do sarcômero: a Transformada de Fourier (FFT), e a função de autocorrelação (ACF).

A FFT decompõe os harmônicos de um sinal. Para a região de interesse (ROI) selecionada a FFT determinará o período do sinal. Para sinais periódicos, como o caso da estriação linhas Z dos cardiomiócitos, a ACF é uma função com o mesmo período do sinal [52, 53].

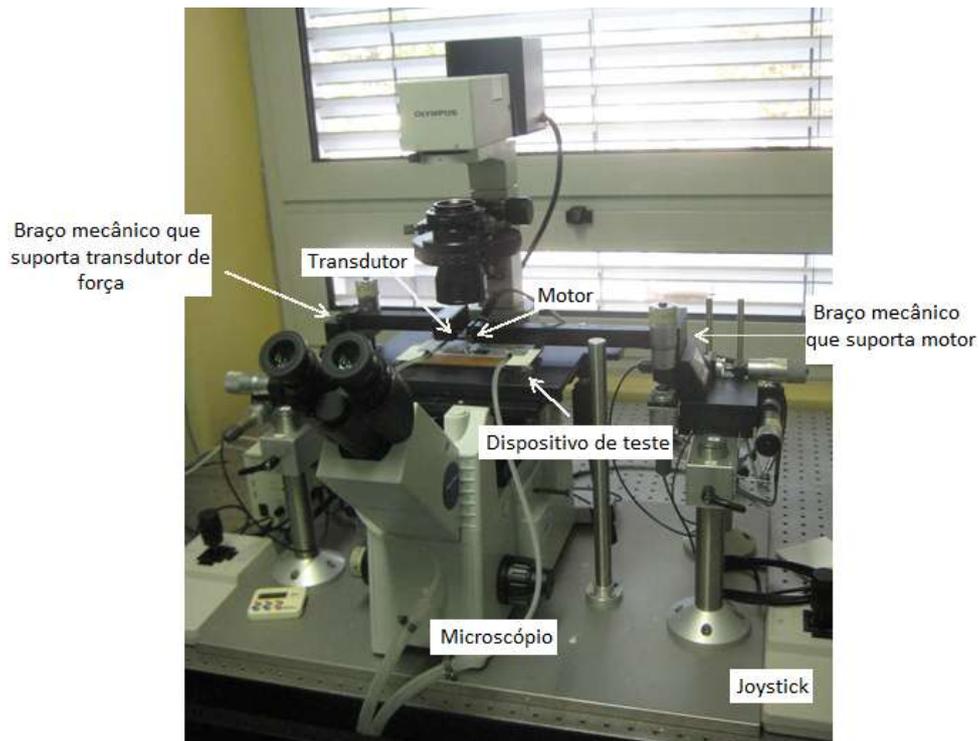
## 4.2 MONTAGEM E CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO

Como um dos objetivos deste trabalho, foi realizada a montagem de todos os componentes do equipamento.

A implementação iniciou-se com a instalação do microscópio, dado que componentes como o transdutor de força, o controlador e o dispositivo de teste necessitam de ser encaixados a distâncias fixas deste, como mostra a Figura 25. A estabilidade do Olympus IX51 é elevada, possui um *layout* ergonómico e uma posição baixa dos controlos, que o tornam de uso simplificado. As objetivas fornecidas foram as 4x, 10x e 20x.

Foi necessário adquirir, também, uma fonte de alimentação externa para microscópio (Olympus Th4-200) fornecida com u a lâmpada de halogénio de 100W. Esta fonte possui um interruptor ON/OFF e possibilita o ajuste de intensidade da luz, localizando-se ao lado do microscópio.

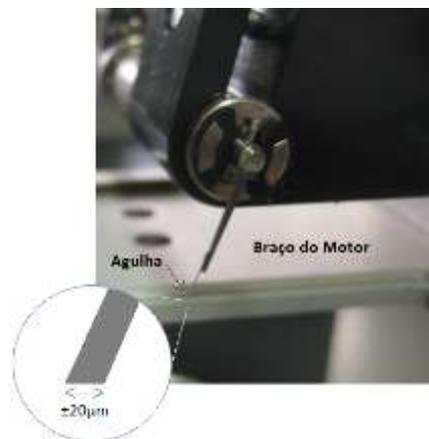
Os dispositivos de maior relevância no equipamento, o transdutor de força e o controlador, requereram uma instalação cuidadosa dada a sua fragilidade.



**Figura 25** - Integração dos componentes do setup. Braços mecânicos dos transdutor e controlador sobre o microscópio óptico invertido (IX51).

#### 4.2.1 AJUSTE DO MOTOR E DO CONTROLADOR DE COMPRIMENTO

O primeiro dispositivo a ser instalado foi o controlador de comprimento (Aurora Scientific Inc., Modelo HSVL 315C-I). Ao braço do motor colou-se uma agulha de fibra de carbono, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento e 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, facultando um suporte para a fixação da célula (Figura 26).



**Figura 26** - Agulha colocada no braço do motor e pormenor da base da agulha.

O terminal da agulha, ao qual se fixará a célula, foi polido com uma lixa de modo a ficar com uma base de cerca de 20  $\mu\text{m}$ , capaz de sobrepor a totalidade da largura do cardiomiócito (Figura 26). A colagem foi minuciosa para garantir que a agulha permanecesse numa posição correta.

O correto funcionamento do controlador foi garantido pela calibração realizada aquando da sua instalação, após a colocação do motor no braço mecânico e da sua ligação à caixa eletrónica de controlo.

O ajuste do controlador PID permitiu ver a sua resposta ao degrau, tornando-a mais rápida ou mais lenta. Para realizar este procedimento, recorreu-se a um osciloscópio e a um gerador de funções. Através de cabos BNC, ligou-se o CH1 (canal 1) do osciloscópio à saída (Length OUT – Figura 27) e o gerador de funções à entrada do controlador (Length IN – Figura 27). Aplicou-se uma onda quadrada de 1V pico-a-pico, com uma frequência de 50Hz, à entrada do controlador, monitorizando o sinal de saída no osciloscópio [47].



Figura 27 - Painel frontal da caixa eletrónica do controlador de comprimento de alta velocidade.

Para aceder ao circuito eletrónico de controlo do motor, abriu-se a caixa da Figura 27. No circuito é possível aceder a todos os componentes, inclusivamente os potenciómetros R25, R28, R31 e R59. Para ver a resposta ao sinal de entrada aplicado, rodou-se o potenciómetro R28, no sentido do ponteiro dos relógios, até se começar a ver uma onda quadrada sub-amortecida, tal como ilustra a Figura 28 A.

Para a obtenção de uma onda quadrada criticamente amortecida, tal como mostra a Figura 28 F, rodou-se alternadamente, no sentido dos ponteiros do relógio, os quatro potenciómetros R31, R28, R25, R59 [47].

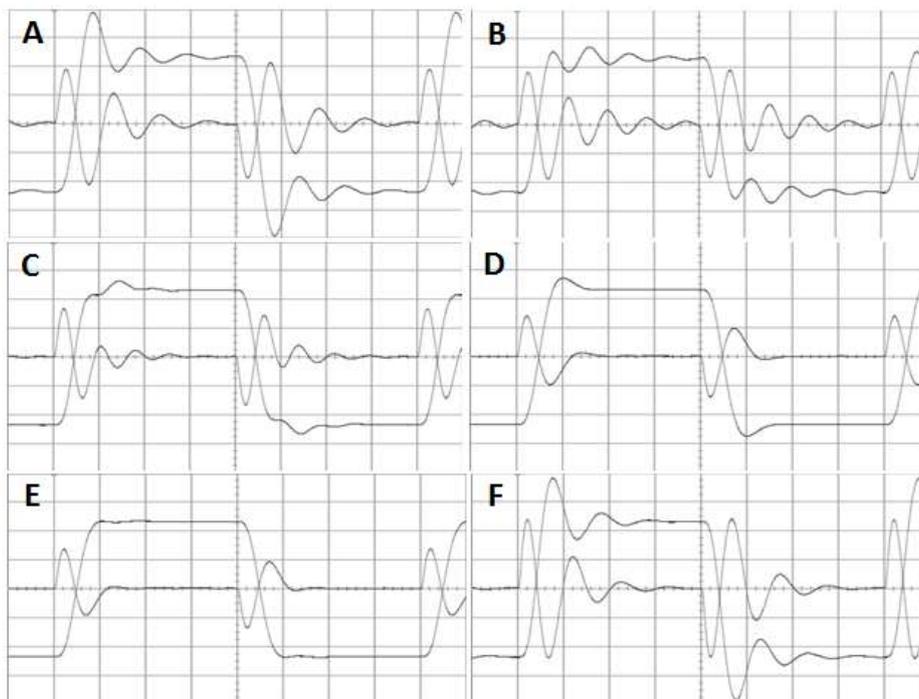
Cada um dos potenciômetros tem um efeito diferente:

1. R31 é o potenciômetro integrador de erro. Ele controla o ganho do motor ou a velocidade do sistema. Quando este componente é afinado, o sistema responde mais rapidamente a uma entrada em degrau, isto é, diminui o tempo de resposta e aumenta a velocidade do sistema.

2. R28 é o potenciômetro amplificador de erro. Ele produz uma mola elétrica que age como uma força restauradora no motor. Esta força age na direção da posição final ordenada. Com a sintonização limita-se o *overshoot* do sistema.

3. R25 é o potenciômetro diferenciador de posição. Isto proporciona baixa frequência de amortecimento ao sistema. Rodando-o no sentido do ponteiro dos relógios, aumenta-se o amortecimento no início do processo de ajuste, mas logo fica sem largura de banda. Nesse momento deve rodar-se o R59 em conjunto com o R25.

4. R59 é o potenciômetro integrador. Ele fornece amortecimento de alta frequência ao sistema. Usa-se este potenciômetro em conjunto com o R25 para amortecer uma onda quadrada sub-amortecida, depois do R25 perder a sua eficácia.



**Figura 28** - (A) Resposta sub-amortecida; ajustamento de: (B) R28 para remover overshoot; (C) R25 para remover oscilação de baixa frequência; (D) R59 para remover a oscilação de alta frequência; (E) R28 para remover overshoot; (F) R31 para aumentar a velocidade do sistema.

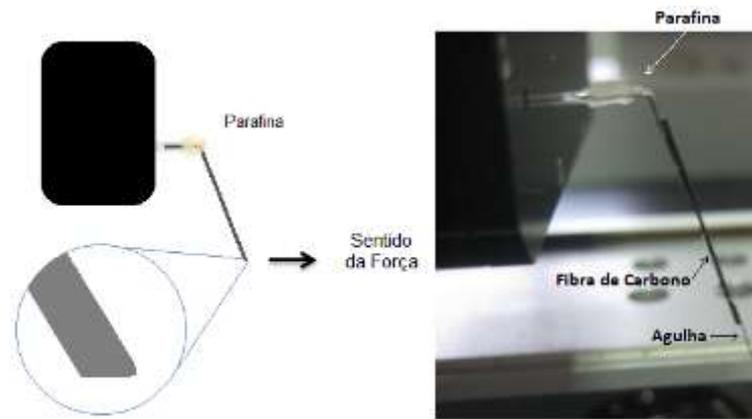
Este procedimento envolve o ajuste do potenciômetro R31 para aumentar o ganho (Figura 28 A); em seguida, ajusta-se o R28 para aumentar o amortecimento e eliminar o overshoot (Figura 28 B); rodando os potenciômetros R59 e R25, elimina-se as oscilações de baixa e alta frequência, respectivamente (Figura 28 C e D). Após estes ajustamentos, haverá overshoot, que deverá ser eliminado pela adaptação do R28, novamente (Figura 28 E). Nesta etapa, a onda deve aproximar-se da criticamente amortecida. Contudo a velocidade, tempo de subida, não corresponde à indicada pelos fabricantes (0,5ms), portanto será necessário ajustar novamente o R31 (Figura 28 F). Todos os ajustes anteriores devem ser repetidos até se encontrar uma onda criticamente amortecida, com tempo de subida igual ou inferior a 0,5 ms. Quando o ganho é ajustado pela rotação do potenciômetro R31 é preferível que não se aumente o ganho abruptamente mas sim em porções pequenas [47].

Depois da instalação e calibração completas, testou-se o funcionamento do motor. Primeiro, moveu-se o motor uma certa distância e verificou-se que respondia à alteração de distância, ou neste caso ao movimento, pela variação da tensão de saída, apresentada no painel frontal (Figura 27).

Para testar o seu bom funcionamento optou-se por enviar uma ordem ao motor para se mover uma distância conhecida e comprovar o bom funcionamento quer do controlador quer do motor. Assim sendo, criou-se um pequeno protocolo no programa ASI600A, com a função “Length-step” que permite uma rotação instantânea do motor. Com a monitorização da imagem em tempo real, pelo programa VSL, conseguiu-se atestar a variação do comprimento desejado.

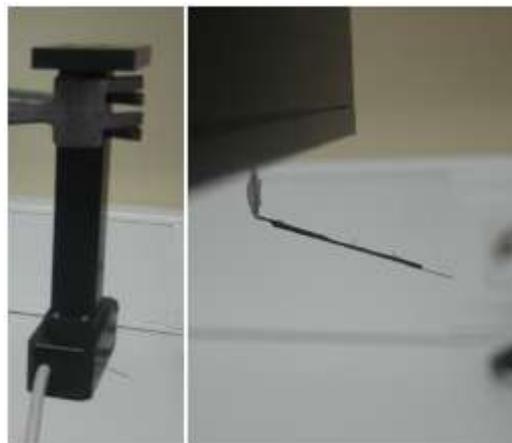
#### 4.2.2 AJUSTE DO TRANSDUTOR DE FORÇA

O segundo dispositivo montado sobre o microscópio foi o transdutor de força. Ao topo do transdutor, colou-se uma fibra de carbono (com cerca de 1,5 cm) a qual se tinha previamente colado uma agulha, para possibilitar a sua fixação à célula. Esta fibra foi colada com parafina, tendo em atenção quer a sua orientação, quer a sua firmeza, importante para a robustez dos resultados obtidos na medição da força.



**Figura 29** - Cabeça do transdutor com fibra de carbono e agulha anexadas. Sentido da força nas medições realizadas – uso em tensão.

Este dispositivo necessitou de calibração, que foi realizada pelo ajuste do *offset* e do ganho do sistema. Uma vez que o transdutor é usado em tensão (Figura 29), montou-se o dispositivo na vertical com a cabeça direcionada para baixo, tal como mostra a Figura 30.



**Figura 30** - Montagem do transdutor de força para a realização da calibração.

A calibração é feita colocando pesos diretamente na extremidade da agulha. Para não danificar a agulha recorreu-se a elásticos de borracha com pesos variáveis.

O processo de ajustamento do transdutor de força iniciou-se pela remoção da tampa da caixa eletrónica, permitindo o acesso ao circuito (Figura 31).



**Figura 31** - Circuito electrónico do transdutor de força, em evidência os potenciômetros de ajuste do *offset* e do ganho do sistema.

De seguida, localizaram-se os dois potenciômetros correspondentes ao *offset* (R15) e ao ganho (R9) do sistema. Girando o potenciómetro R15, colocou-se a tensão de saída a 0,000V.

**Tabela 3** - Peso de Calibração, tensão de saída e fator de escala do transdutor 403A.

Modelo 403A	
Peso [mg]	50
Tensão de saída [V] (Ganho 1X)	1
Fator de Escala [mg/V]	0.5

Tendo por base a Tabela 3, colocou-se o peso adequado na agulha (Figura 32) e verificou-se qual a tensão de saída, rodando o potenciómetro R9 até o valor ser o indicado. Retirou-se o peso, cuidadosamente, e reajustou-se o *offset* para 0,000V.



**Figura 32** - Colocação de elásticos, pesos, na agulha do transdutor para registo das tensões durante a calibração.

Repetiu-se este processo até que a tensão fosse nula sem o peso no transdutor, e até que fosse a esperada com o peso. Por regra, esta calibração necessita de vários ajustamentos dos dois potenciômetros uma vez que o *offset* influencia o ganho e vice-versa. Quando o ajustamento termina, verifica-se a calibração, colocando vários pesos diferentes conhecidos e registando os valores de tensão de saída. Estes valores são usados para construir a curva de calibração, no programa ASI600A, e verificar a sua linearidade.

#### 4.2.3 AJUSTE DO SISTEMA DE VISUALIZAÇÃO

A calibração da escala no programa VSL é muito importante quer para a medição do comprimento do sarcómero quer para a obtenção das dimensões dos cardiomiócitos. O ajustamento desta escala depende da objetiva a utilizar. O programa fornece dois tipos de escala, ajustáveis para duas objetivas.

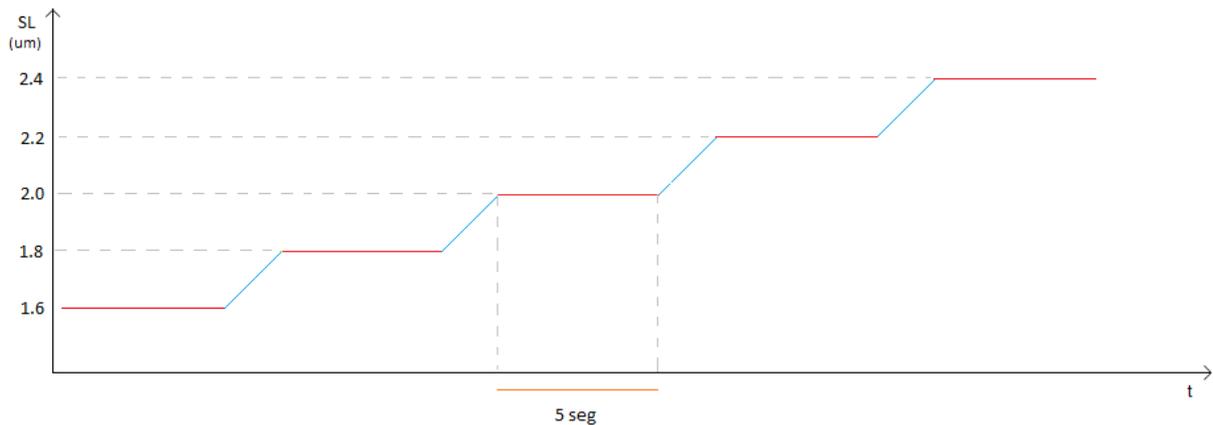
Colocando uma escala micrométrica no campo de visão do microscópio, e visualizando em tempo real a sua imagem no ecrã, selecionou-se uma região de interesse sobre a escala fazendo-a corresponder ao comprimento real. O processo foi realizado para as objetivas 10x e 20x, correspondendo no programa à “Low-magnification” e “High-magnification”, respetivamente. A ampliação é selecionada consoante a objetiva usada.

### 4.3 PROTOCOLO DE ESTIRAMENTO DO CARDIOMIÓCITO

O estiramento dos cardiomiócitos simula o enchimento das câmaras cardíacas e permite realizar uma avaliação das propriedades elásticas destas células.

Usando as funções “Data-Enable”, que inicia a aquisição de dados, “Data-Disable”, que termina a mesma aquisição, e “Stop”, que finaliza o protocolo, disponibilizadas pelo programa ASI 600A (Apêndice 1 – Funções do programa ASI 600A), criou-se um protocolo para aquisição do valor de força para SL de 1,6, 1,8, 2,0, 2,2 e 2,4  $\mu\text{m}$ .

Este protocolo consiste na aquisição do valor de força durante 5 segundos no SL pretendido, a uma frequência de amostragem de 2000 Hz. A Figura 33 ilustra o processo de estiramento, mostrando a variação do SL em função do tempo decorrido.



**Figura 33** - Ilustração do processo de estiramento do cardiomiócito.

O protocolo de estiramento criado é apresentado no Apêndice 2 – Protocolo de estiramento.

#### 4.4 PROTOCOLO DE MEDIÇÃO DE FORÇA

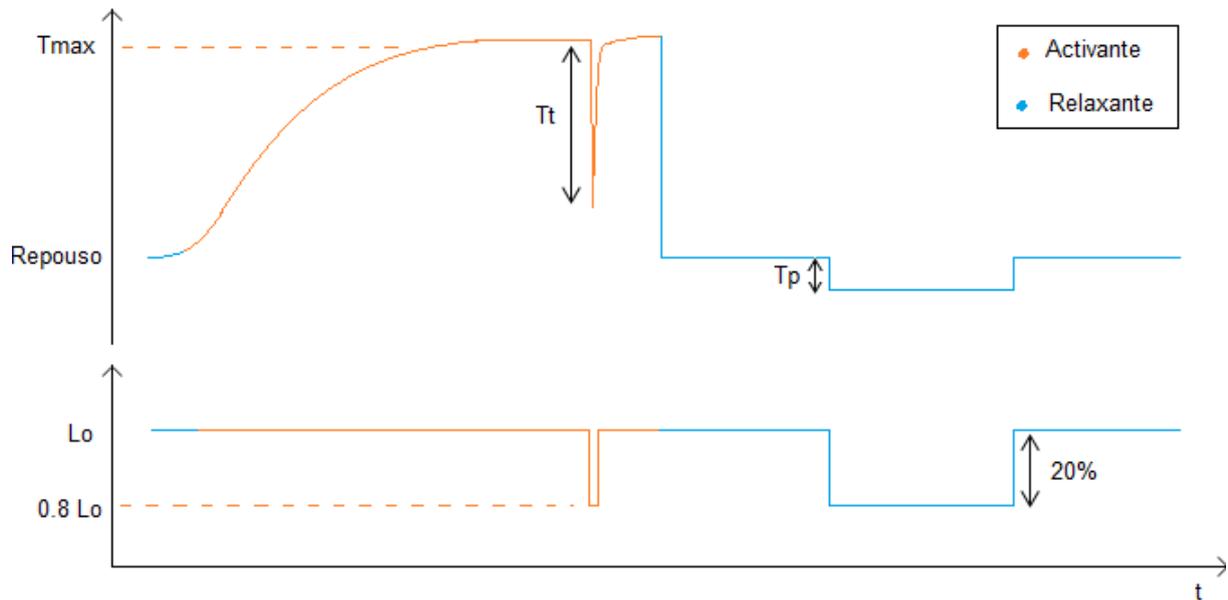
Tendo como base o leque de funções disponíveis no programa ASI 600A (Apêndice 1 – Funções do programa ASI 600A), criou-se o protocolo para medir a força em cada cardiomiócito, para cada concentração de cálcio a utilizar. Todos os parâmetros das funções, o tempo de início de cada uma delas, bem como a frequência de amostragem tiveram de ser definidos no mesmo protocolo.

As funções usadas foram a “Step-Length”, que altera o comprimento instantaneamente, “Data-Enable”, a “Data-Disable” e a “Stop” [51]. A frequência de amostragem fixou-se nos 2KHz. A partir deste protocolo, pretendia-se recriar uma curva de tensão como a representada na Figura 34.

O protocolo baseou-se no encurtamento da célula em cerca de 20% do seu comprimento inicial, primeiro na solução ativante durante 3 ms, possibilitando a medição da tensão total (Tt) desenvolvida pelo cardiomiócito, e depois, durante 10 s em relaxamento, obtendo-se a tensão passiva (Tp) (Figura 34). A ativação da célula a uma concentração saturada de cálcio (pCa<sup>b</sup> 4.5) teve como finalidade calcular a tensão máxima desenvolvida. Esta ativação foi repetida para a mesma concentração e de seguida para valores de pCa mais

<sup>b</sup>  $pCa = \log_{10}[Ca^{2+}]$

baixos, numa ordem aleatória. Para finalizar, o cardiomiócito foi colocado novamente na solução de concentração mais elevada, como medida de controlo.



**Figura 34** - Sequência contração-relaxamento esperada para o protocolo experimental usado, com  $T_{max}$  a tensão máxima de activação da célula,  $T_t$  a tensão total,  $T_p$  a tensão passiva,  $L_o$  o comprimento inicial da célula, ativante: solução com  $[Ca^{2+}]$  saturante; e relaxante: solução com baixa  $[Ca^{2+}]$ .

O protocolo criado é apresentado em anexo no Apêndice 3 – Protocolo de medição de força.

#### 4.5 ANÁLISE DE DADOS

Os dados resultantes das medições de força dos cardiomiócitos, ficam disponíveis em ficheiros idênticos ao do Apêndice 4 – Ficheiro de dados. Para extrair os dados a serem analisados, construiu-se um pequeno algoritmo.

Tendo presente a Figura 34, com base nos tempos de início de cada função e na frequência de amostragem definidos no protocolo criado (Apêndice 3 – Protocolo de medição de força), o algoritmo consiste em:

1. Abrir ficheiro de dados;
2. Na tabela com os registos dos dados adquiridos durante o protocolo, procurar o instante 1000 ms (coluna correspondente ao tempo);
3.  $X$  = média dos 30 valores da *Fin* (força medida – 4ª coluna) anteriores ao instante 1000 ms;

4.  $Y$  = valor mínimo dos valores de  $Fin$  durante os instantes 1000 e 1002 ms (correspondente aos 2ms de encurtamento da célula em solução ativante);
5.  $T_t = X - Y$  (cálculo da força total);
6. Na mesma tabela, procurar o instante 11002 ms (início do encurtamento da célula em solução relaxante);
7.  $Z$  = média dos 30 valores de  $Fin$  anteriores ao instante 11002 ms;
8.  $W$  = média dos 30 valores de  $Fin$  posteriores ao instante 11002 ms;
9.  $T_p = Z - W$  (cálculo da força passiva);
10.  $T_a = T_t - T_p$  (cálculo da força ativa).

A normalização dos dados relativos à força medida foi realizada pela área seccional de cada cardiomiócito. Considerou-se que a secção da célula era elíptica. Na impossibilidade de determinar a profundidade do cardiomiócito, assumiu-se o valor do diâmetro menor como sendo 70% do diâmetro maior, correspondente à largura medida ( $L$ ). Assim sendo, a expressão usada para calcular a área foi:

$$A_s = \pi \times \frac{L}{2} \times \frac{0,7 L}{2} = \pi \times \frac{0,7 L^2}{4}$$

A curva que relaciona a tensão passiva ( $T_p$ ) com o comprimento do sarcómero ( $SL$ ), obtida a partir dos valores obtidos durante o estiramento da célula, foi construída com recurso a uma função exponencial. O declive desta curva representa a constante de rigidez ( $K_c$ ) e foi determinado com recurso ao programa GraphPad Prism 5.0.

A curva de relação força- $pCa$  foi construída utilizando a equação modificada de Hill, expressa por:

$$F(Ca^{2+})/F_{max} = [Ca^{2+}]^{nH} / (pCa_{50}^{nH} + [Ca^{2+}]^{nH})$$

Onde  $F$  é a força em estado estacionário (força máxima de activação para cada solução ativante),  $F_{max}$  a força isométrica máxima numa concentração de cálcio saturada ( $pCa$  4.5),  $nH$  o coeficiente de Hill correspondente ao declive da curva, e o  $pCa_{50}$  que representa o ponto médio da relação.

Para a construção e análise desta curva recorreu-se ao programa KaleidaGraph 3.6.

## 5 MÉTODOS EXPERIMENTAIS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA

Neste capítulo descrever-se-ão os métodos utilizados experimentalmente para avaliar a função cardíaca em animais normais e com IC induzida. Esta avaliação foi realizada em músculos papilares e em cardiomiócitos isolados, extraídos do coração dos animais. Foram, ainda, estudados os efeitos agudos da adiponectina e da insulina. Para controlar a progressão do fenótipo da cardiomiopatia induzida recorreu-se à avaliação ecocardiográfica.

As experiências realizadas com animais decorreram de acordo com a lei portuguesa do bem-estar animal, aplicando as diretrizes do *Guide for the Care and Use of Laboratory* publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH Publication Nº 85-23, Revised 1996). Os protocolos foram devidamente avaliados pelas autoridades veterinárias portuguesas (DGV).

### 5.1 MODELO ANIMAL

Nas experiências laboratoriais realizadas recorreu-se à utilização de animais, nos quais foi induzida IC. Os animais utilizados foram coelhos brancos Neo-Zelandeses (*Oryctolagus cuniculus*). A escolha deste modelo para estudar insuficiência cardíaca humana é adequada porque as semelhanças na composição das proteínas do sarcómero entre os humanos e o modelo animal selecionado são críticas para caracterizar a patogénese do fenótipo. Além disso, o coelho é de fácil manuseamento, fácil observação, e permite a utilização de um grande número de indivíduos. [54, 55].

O estudo foi realizado em 25 coelhos, machos adultos com pesos iniciais entre os 2 e os 2,5 Kg. Estes animais foram colocados em gaiolas, com água e comida *ad libitum*.

A indução da IC foi induzida pela administração de doxorrubicina (Doxo). Os coelhos foram injetados com esta substância (1 mg/Kg), por via intravenosa (IV), na veia marginal da orelha. A administração da doxorrubicina foi bissemanal e decorreu ao longo de 8 semanas (n=10), seguindo-se um período de *washout* de uma semana. O grupo controlo, constituído por 15 coelhos, recebeu uma dose equivolumétrica de veículo (NaCl 0,9%) durante o mesmo período de tempo.

## 5.2 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Os coelhos foram sujeitos a avaliação ecocardiográfica às 0 semanas para despistar qualquer anomalia cardíaca pré-existente. Esta avaliação foi realizada ao longo do processo de indução da IC (às 4 e às 8 semanas) por um técnico especializado, para observar a progressão da doença. Previamente a cada avaliação ecocardiográfica, os coelhos foram anestesiados com cetamina (75 mg/Kg) e midazolam (5 mg/Kg) e deixados a estabilizar durante 10 minutos.

Os parâmetros ecocardiográficos foram obtidos através de uma avaliação bidimensional, em modo-M e por Doppler, realizada com um ecocardiógrafo Aloka Color Doppler SSD-2200 (VingMed Ultrasound, GE) equipado com uma sonda de 5 MHz. Foram obtidas projeções do eixo curto e longo do VE nas janelas paraesternal direita e subcostal. Os parâmetros obtidos neste processo foram: a espessura do septo intraventricular (IVS, mm) e da parede posterior esquerda (LVPW, mm), o diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole e diástole (LVDs, LVDd, mm), a fração de encurtamento (FS, %), a fração de ejeção (FE, %), a velocidade das ondas E e A (m/s), e a massa do ventrículo esquerdo (LVM, mg).

## 5.3 ESTUDOS FUNCIONAIS EM MÚSCULOS PAPILARES

As medições isométricas e isotônicas foram realizadas em músculos papilares isolados do ventrículo direito de coelhos 1 semana depois da última administração de doxorubicina ou soro. Os coelhos foram eutanasiados através de uma injeção de pentobarbital sódico (25 mg/Kg) na veia marginal da orelha.

O coração foi rapidamente removido através de uma toracotomia<sup>c</sup>. O coração foi imerso numa solução de *Krebs-Ringer* ainda a contrair. As soluções preparadas mantiveram-se a uma temperatura de 37,2°C, e o pH foi acertado para o intervalo de 7.38 a 7.42. A solução inicial de Krebs continha soro bovino (BSA) a 5%, e 3% do composto cardioplégico<sup>d</sup> 2,3-butanediona (BDM).

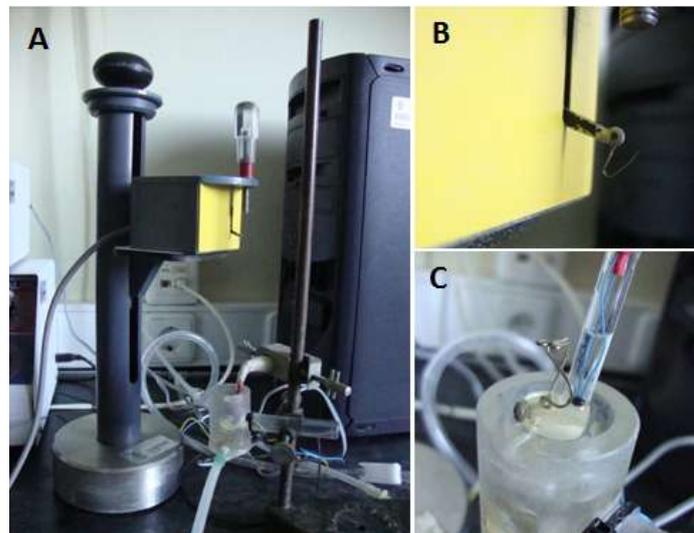
---

<sup>c</sup> Toracotomia - abertura da cavidade torácica para examinar as estruturas expostas cirurgicamente.

<sup>d</sup> Cardioplégico – promove a paragem dos batimentos cardíacos por inibição da formação de pontes cruzadas.

Antes da abertura do ventrículo direito do coração dos coelhos, para a extração dos músculos papilares, foi retirado o ápice e congelado de imediato em azoto líquido, para minimizar a degradação das proteínas contrácteis. Cada ápice foi identificado e devidamente acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, o ventrículo direito foi aberto e os músculos papilares foram isolados, dissecados, e montados verticalmente em banhos próprios com cerca de 10 ml de solução de *Krebs-Ringer* com BDM e BSA. A extremidade inferior dos músculos foi fixa num clip de fosfobronze e a extremidade superior, tendinosa, foi fixa a um transdutor isotónico-isométrico.



**Figura 35 - (A)** Setup músculo isolado; **(B)** local de ligação da parte superior do músculo ao transdutor; **(C)** local de fixação da base do músculo papilar.

A pré-carga foi determinada de acordo com o tamanho do músculo e foi aplicado um estímulo elétrico de 3,5 mV (com pulsos retangulares com a duração de 5 ms, intercalados por 1670 ms, perfazendo uma frequência de 0,6 Hz), através de dois elétrodos de platina orientados paralelamente ao músculo papilar. Quinze minutos depois, a solução foi substituída por outra idêntica mas sem BDM. Esperou-se que o músculo estabilizasse e substituiu-se a solução por *Krebs-Ringer* sem o soro bovino. Deixou-se estabilizar e calculou-se o  $L_{\max}$  (mm).

De dez em dez minutos registou-se uma contração isométrica e uma isotónica. O músculo considerou-se estável quando duas medições isométricas e isotónicas consecutivas

apresentavam curvas sobreponíveis. Nesta altura iniciou-se o protocolo mantendo uma temperatura constante de 35°C nos banhos.

Os parâmetros avaliados foram: tensão ativa ( $T_a$ ,  $\text{mN}/\text{mm}^2$ ), velocidade máxima de elevação da tensão ( $dT/dt_{\text{max}}$ ,  $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ ), velocidade máxima de queda de tensão ( $dT/dt_{\text{min}}$ ,  $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ ); pico encurtamento máximo (PS, %  $L_{\text{max}}$ ), velocidade de contração ( $dL/dt_{\text{max}}$ ,  $L_{\text{max}}/\text{s}$ ), velocidade máxima de relaxamento ( $dL/dt_{\text{min}}$ ,  $L_{\text{max}}/\text{s}$ ), e tempo para a velocidade de relaxamento ( $t_{\text{VR}}$ , ms), tempo de encurtamento máximo ( $t_{\text{PS}}$ , ms), tempo para a tensão ativa ( $t_{\text{Ta}}$ , ms), tempo para atingir o pico de encurtamento ( $t_{\text{PS}}$ , ms) e o tempo para metade do relaxamento ( $t_{\text{HR}}$ , ms).

A área de secção transversal dos músculos foi calculada através da divisão do peso pelo comprimento muscular. Assumiu-se um formato muscular cilíndrico e a tensão muscular foi expressa como força normalizada para a área de secção transversal ( $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ).

A função contráctil dos músculos papilares dos coelhos foi analisada a nível basal, e em resposta a doses crescentes de adiponectina (Adipo) e/ou insulina (Ins). Cada uma das três doses de Adipo (0,04 mM; 0,31 mM e 3,67 mM) foi administrada com intervalos de tempo correspondentes à estabilização da resposta à dose anterior, assim com as doses de Ins (0,05 U/ml, 0,5 U/ml e 10 U/ml). Para cada dose obteve-se uma aquisição isotónica e uma isométrica. Num grupo de músculos papilares (7 controlo e 5 sujeitos à doxorubicina) apenas foram dadas doses de insulina, noutro (6 controlo e 9 doxorubicina) foram dadas doses de adiponectina seguidas de insulina, e nos restantes (8 controlo e 10 doxorubicina) apenas adiponectina.

#### 5.4 ESTUDOS FUNCIONAIS EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

A avaliação da contractilidade cardíaca foi, também, realizada em cardiomiócitos isolados para se compreender possíveis alterações dos mecanismos subcelulares adjacentes à insuficiência cardíaca. Para se proceder a esta avaliação recorreu-se, como anteriormente referido, a um equipamento especialmente desenhado para medições fisiológicas. A Aurora Scientific Inc. forneceu o transdutor de força (Modelo 403A), o controlador de comprimento (Modelo 315C-I), o software para aquisição de dados (ASI 600A) e o software para aquisição de imagem em tempo real (VSL 900B).

#### 5.4.1 BIÓPSIAS

Para o isolamento de cardiomiócitos utilizaram-se amostras com cerca de  $4 \text{ mm}^3$  extraídas dos ápices congelados. Foram estudadas células cardíacas de 8 coelhos controlo e de 7 coelhos submetidos à administração de doxorrubicina.

Após a excisão, cada amostra foi descongelada e imersa em 2,5 mL de solução de relaxamento fria (Relax). Num recipiente apropriado, e mantendo a temperatura baixa (aproximadamente  $4^\circ\text{C}$ ), a amostra foi cortada em fragmentos mais pequenos ( $<1 \text{ mm}^3$ ), para depois serem sujeitos ao isolamento mecânico.

#### 5.4.2 ISOLAMENTO MECÂNICO

Os fragmentos, imersos na solução Relax, foram transferidos para um tubo cilíndrico de vidro, com capacidade para 5 mL. Com um pistão de plástico com sulcos (Plastilab Kastell 6105) (Figura 36 B), adequado ao tubo, a amostra sofreu rotura mecânica durante 3 a 10 segundos, a uma velocidade de 1200 rpm, num homogeneizador de tecidos (Terre Haute Glas-col, GKH GT Motor Control) (Figura 36 A).

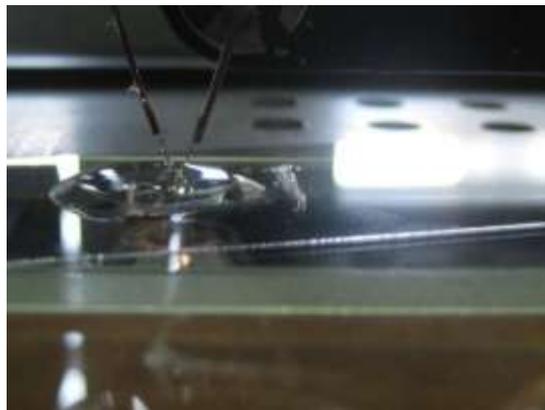


**Figura 36 - (A)** Homogeneizador de tecidos e **(B)** pistão de plástico usados para o isolamento mecânico dos cardiomiócitos.

A suspensão obtida, com cardiomiócitos, aglomerados de cardiomiócitos e fragmentos celulares, foi adicionada a 2,5 mL de solução Relax detergente 0,5% de Triton X-100 durante 5 minutos para remover todas as estruturas membranares. Após o tempo decorrido, acrescentou-se solução Relax à preparação, até perfazer um volume de cerca de 14 mL. O tubo com a suspensão foi sujeito a centrifugação de 1500 rpm durante 1 minuto, a  $4^\circ\text{C}$ . Depois, foi retirado o sobrenadante e acrescentada solução Relax até perfazer os 14 mL.

Este processo de lavagem foi repetido 4 vezes com o objetivo de eliminar completamente o Triton.

Uma vez terminado o isolamento dos cardiomiócitos, a preparação foi colocada no dispositivo de teste (Figura 37), localizado no microscópio (Olympus IX51). Pela observação microscópica, ou pela visualização em tempo real no software VSL (ASI - Aurora Scientific Inc., Modelo 900B), foram analisadas e escolhidas as células cardíacas com um padrão de estriação uniforme. As imagens foram obtidas com recurso a uma câmara de vídeo CCD (UEye) e visualizadas a ampliações de 10x e 20x.



**Figura 37** - Gota com suspensão de células colocada sobre o dispositivo de teste.

Para a colagem das células às agulhas do transdutor e do motor utilizou-se cola silicone de aquário. Foi aplicada uma gota de silicone em cada agulha, e colocada cada uma das agulhas sobre as extremidades do cardiomiócitos. O processo de fixação das células às agulhas teve a duração de cerca de 40 minutos.

#### 5.4.3 AJUSTE DO COMPRIMENTO DO SARCÓMERO

Após a fixação do cardiomiócito às agulhas do transdutor e do motor, foi necessário ajustar o comprimento do sarcómero. Geralmente, o SL inicial da célula em repouso varia entre os 1,6 e os 1,8  $\mu\text{m}$ . Para avaliar as propriedades elásticas do cardiomiócito, adquiriram-se valores de força ao longo do estiramento da célula, para SL de 1,6, 1,8, 2,0, 2,2 e 2,4  $\mu\text{m}$ , sempre que possível. Desta forma, simula-se o enchimento cardíaco, como referido anteriormente.

Através do programa VSL 900B, seleciona-se uma ROI sobre uma zona de estriação visível na imagem observada no ecrã. Optando pelo algoritmo da ACF, determina-se o valor do SL, ajustando-o com o auxílio dos micromanipuladores.

Uma vez que o desenvolvimento de força é máximo para SL de 2,2 µm, no final do processo de estiramento da célula ajustou-se o SL para este comprimento.

#### 5.4.4 PROTOCOLO

As soluções de relaxamento (pCa 9.0) e ativante (pCa 4.5) foram colocadas em dois dos seis poços disponíveis no dispositivo de teste. Pelo movimento da platina do microscópio, a célula já colada foi transferida para a solução de relaxamento e, posteriormente, para a solução ativante.

Quando o cardiomiócito foi colocado na solução ativante, começou a gerar força. Logo que a força atingiu o seu nível mais elevado e estabilizou, iniciou-se o protocolo, já explicado anteriormente.

As medições intermédias do protocolo foram feitas com soluções de valores de pCa entre os 4,5 e os 6,0. A ordem das soluções utilizadas manteve-se para todos os cardiomiócitos: pCa 5,2; 5,6; 6,0; 5,0; 5,4 e 5,8.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores são apresentados através da sua média ± e.p.m. (erro padrão da média). O erro padrão médio foi calculado através da expressão:

$$e.p.m. = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

em que  $s$  é o desvio padrão e  $n$  o número de amostras.

A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0.

Para determinar como a resposta às doses crescentes de Adipo e Ins varia para os grupos controlo e doxorrubicina, utilizou-se um teste Two-way ANOVA, e para determinar se houve variação significativa entre doses dentro do mesmo grupo recorreu-se a uma One-way ANOVA para medições repetitivas.

As diferenças morfológicas entre cada grupo e as diferenças nas médias de cada parâmetro foram avaliadas através de um teste *t* de Student. Todos os valores de *p* inferior a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados significantes.

## 6 RESULTADOS

No capítulo 6, apresentar-se-ão os resultados obtidos no decurso deste trabalho: da implementação do sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos e dos estudos funcionais realizados em músculos papilares isolados. Mostrar-se-ão, ainda, os resultados experimentais obtidos no estudo funcional de cardiomiócitos utilizando o sistema implementado.

### 6.1 IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

Para realizar o estudo em cardiomiócitos isolados foi necessário, como anteriormente referido, implementar um sistema desenhado para avaliações fisiológicas, que incluía, entre outros componentes, um transdutor de força e um controlador de comprimento de alta velocidade. A garantia de um correto funcionamento do sistema foi dada pelos ajustes e pela calibração realizados nos dispositivos que o compõe.

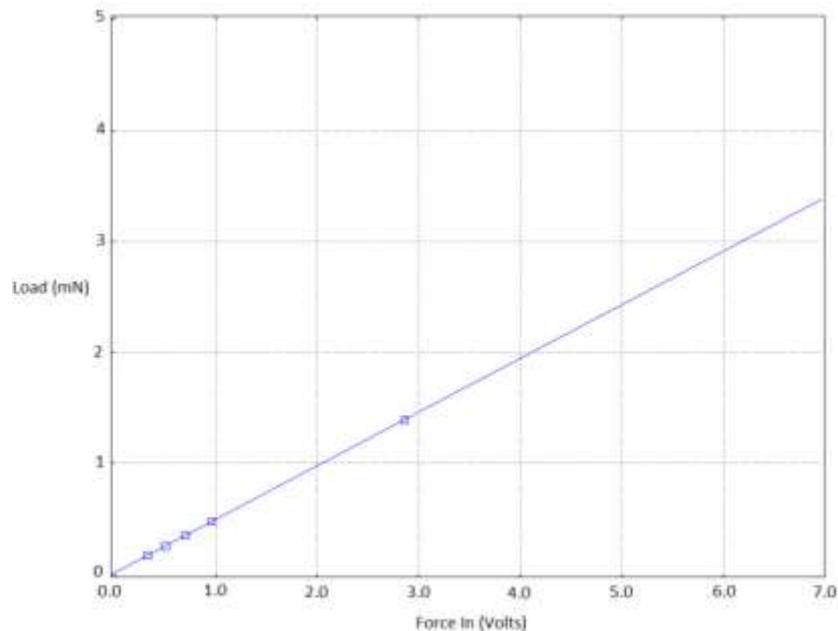
O teste realizado para comprovar o funcionamento do controlador de comprimento revelou uma troca da sua polaridade, dado que o braço do motor rodou no sentido contrário aos ponteiros do relógio. A alteração no circuito electrónico de dois conjuntos de *jumpers*, identificados como “Coil” e “PD”, que rodaram 90°, foi possível a inversão de polaridade desejada.

A calibração do transdutor de força foi obtida pela colocação de cinco pesos na ponta do transdutor, registando para cada peso a tensão de saída. Na Figura 38 apresentam-se os valores dessa tensão de saída para cada peso, bem como os fatores de calibração obtidos.

Weight (gm)	Fin (v)	Calibration Factors	
0.016	0.3314	Force In Scale (mN/v)	0.48376
0.025	0.5072	Force in Offset (mN)	0.00018
0.035	0.7080	Force Out Scale (mN/v)	0.47246
0.048	0.9641	Force Out Offset (mN)	0.01429
0.141	2.8613		

**Figura 38** – Tensão de saída do transdutor, dada em Volts, para cada peso, em gramas, colocado na agulha durante a calibração, e fatores de calibração obtidos: escala, em mN/V, e offset, em mN.

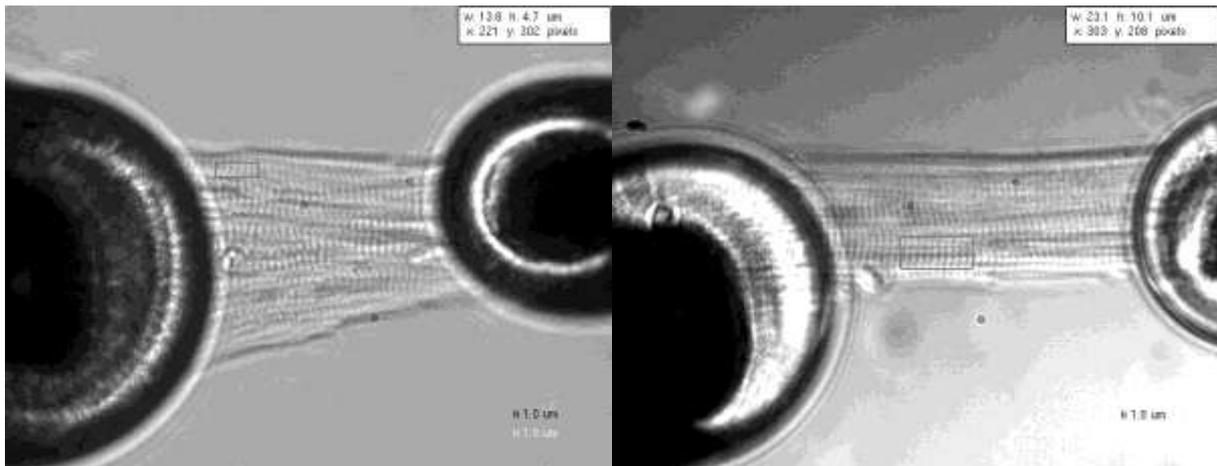
Na figura que se segue (Figura 39), apresenta-se a curva de calibração do transdutor de força implementado para a medição em cardiomiócitos isolados. A curva foi construída no programa ASI600A.



**Figura 39** - Curva de calibração do transdutor de força (Aurora Scientific Inc., modelo 403A).

Como se pode comprovar, a curva de calibração do transdutor de força exhibe uma alta linearidade, como era previsto, tendo um fator de escala de cerca de 0,48376 mN/V e um *offset* de 0,00018 mN/V. Estes são valores muito próximos do indicado pelo fabricante (0,5 mmN/V e 0 mN/V, respetivamente), o que confirma a boa calibração efetuada. Esta calibração terá que ser realizada sempre que o braço do transdutor de força for submetido a diferentes cargas.

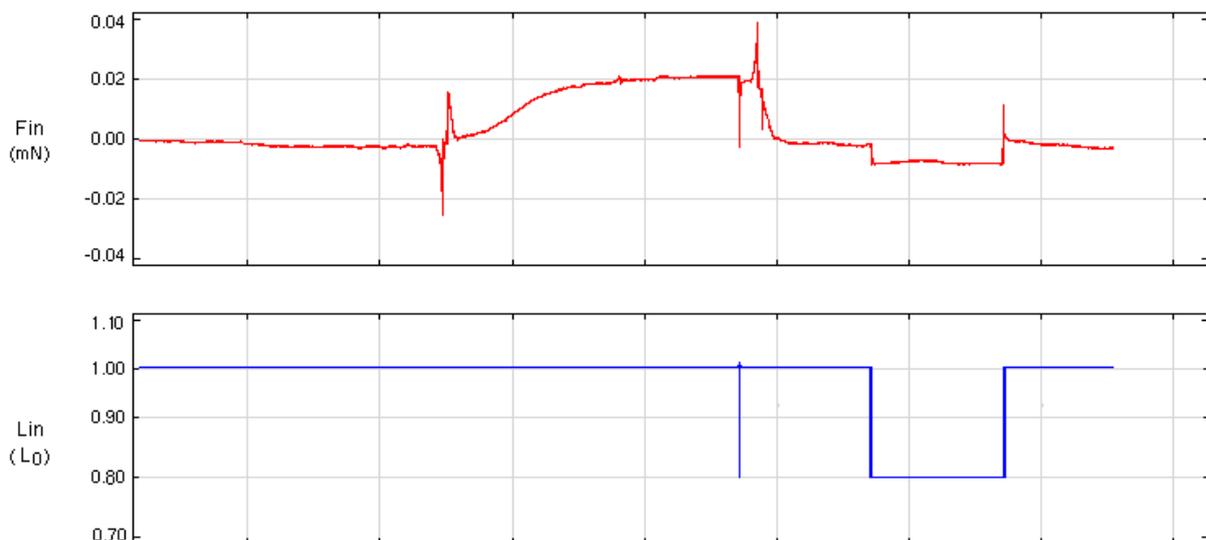
O sucesso do estudo da contractilidade em cardiomiócitos isolados está dependente da colagem das agulhas do transdutor e do motor às extremidades das células. Na Figura 40 estão imagens de dois cardiomiócitos colados, obtidas pela câmara de vídeo do *setup*. É possível observar nestas imagens a estriação das células, que possibilita o cálculo do comprimento do sarcómero.



**Figura 40** - Imagens representativas de cardiomiócitos colados entre o transdutor de força e o motor.

É bem visível nas imagens apresentadas na Figura 40 a estriação celular, que possibilita a determinação do comprimento do sarcômero.

O protocolo criado para obter os vários parâmetros de interesse em cardiomiócitos isolados, como as tensões passiva e activa, tinha como finalidade o registo da força gerada por cada célula em resposta à alteração do seu comprimento durante as fases de contracção e relaxamento. A Figura 41 mostra o registo, ao longo do tempo, de uma sequência contracção-relaxamento durante a realização de um protocolo numa célula cardíaca.



**Figura 41** - Registo da força e do comprimento durante a realização de um protocolo experimental num cardiomiócito isolado, utilizando uma solução ativante de pCa 4.5. A força é dada em mN e o comprimento é expresso em relação ao comprimento inicial da célula,  $L_0$ .

O protocolo experimental final, explicado anteriormente, foi criado para obter as medições isométricas de força e foi implementado com sucesso, obtendo-se uma sequência contração-relaxamento idêntica à desejada.

## 6.2 ESTUDOS FUNCIONAIS EM MÚSCULOS PAPILARES

Os resultados relativos à morfologia dos animais, controlo e sujeitos à doxorubicina, são apresentados na tabela que se segue (Tabela 4). Verificou-se que os animais do grupo Doxo apresentam menor peso corporal que os do grupo controlo ( $p=0.001$ ). Nos restantes parâmetros morfométricos não se verificaram diferenças significativas.

**Tabela 4** - Registo dos dados morfológicos dos coelhos: peso do corpo (Pcorpo), peso do coração (Pcoração), comprimento da tíbia (Ctíbia) e rácio entre peso do coração e comprimento da tíbia (Pcoração/Ctíbia).

† indica resultado estatisticamente significativo.

Parâmetros	Controlo (n=15)	Doxo (n=10)
Pcorpo (g)	3240,67±80,34	2775,50±81,92 †
Pcoração (g)	7,13±0,24	6,55±0,35
Ctíbia (cm)	11,13±0,16	11,46±0,44
Pcoração/Ctíbia (g/cm)	0,62±0,03	0,55±0,02

Na Tabela 5 encontram-se registados os valores basais dos parâmetros de contractilidade e relaxamento obtidos no protocolo realizado com músculos papilares de coelhos controlo e Doxo. Nas medições isotónicas foram obtidos os seguintes parâmetros: a tensão passiva (PT, dado em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), o pico de encurtamento máximo do músculo (PS, em mm), o tempo para atingir o pico de encurtamento (tPS, em ms), a velocidade máxima de encurtamento ( $dL/dt_{\text{max}}$ , em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e a velocidade máxima de relaxamento ( $dL/dt_{\text{min}}$ , em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A tensão activa (AT, dada em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ ), o tempo para atingir a tensão activa máxima (tAT, em ms), a velocidade máxima de aumento da tensão ( $dT/dt_{\text{max}}$ ,

em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a velocidade máxima de queda de tensão ( $dT/dt_{\text{min}}$ , em  $\text{mN}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e o tempo para metade do relaxamento ( $t_{\text{HR}}$ , em ms) foram valores obtidos nas medições isométricas. O comprimento do músculo papilar (Comprimento) é dado em mm, e o peso de cada músculo (Peso) em mg.

Tal como se verifica, não se detetam diferenças significativas entre os dois grupos no que diz respeito à sua performance basal nem às dimensões dos músculos utilizados.

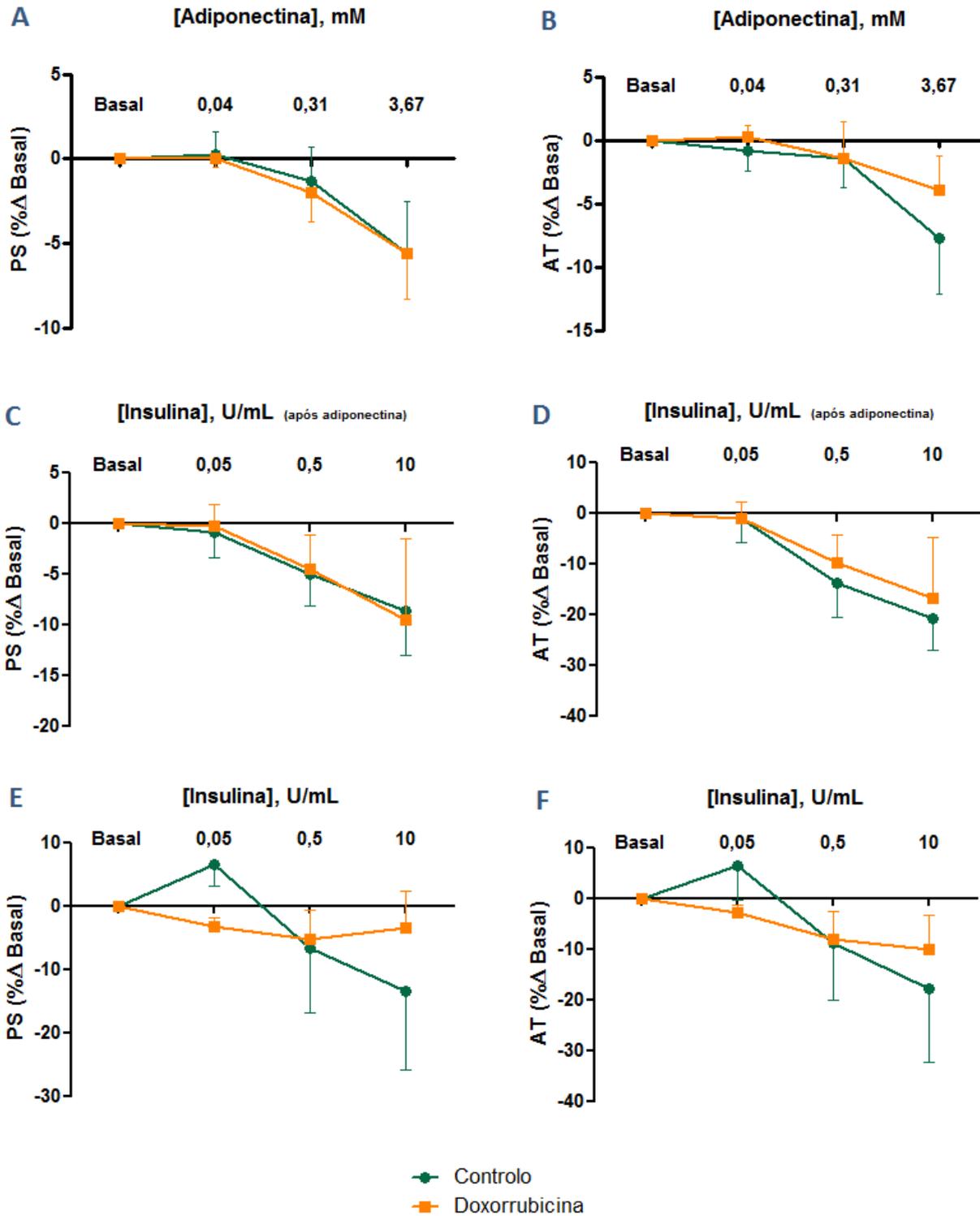
**Tabela 5** - Registo dos parâmetros de contractilidade e relaxamento basais obtidos em protocolos de músculo papilar do ventrículo direito isolado de animais controlo e Doxo.

Parâmetros	Controlo (n=16)	Doxo (n=17)
Comprimento (mm)	4,34±0,26	4,64±0,29
Peso (mg)	3,39±0,34	3,52±0,38
PT ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ )	3,79±0,22	4,04±0,39
PS (mm)	0,12±0,01	0,11±0,01
tPS (ms)	238,61±10,28	246,88±43,69
dL/dtmax ( $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ )	0,88±0,08	0,80±0,06
dL/dtmin ( $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ )	-2,85±0,44	-2,35±0,23
AT ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ )	32,99±6,80	32,62±5,12
tAT (ms)	236,50±11,76	263,06±15,46
dT/dtmax ( $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ )	232,19±56,49	200,75±27,27
dT/dtmin ( $\text{mN}/\text{mm}^2/\text{s}$ )	-158,90±25,55	-147,48±18,64
tHR (ms)	393,61±21,336	437,47±26,477

Os gráficos ilustrados na Figura 42 (A e B) registam dos parâmetros de inotropismo e lusitropismo<sup>e</sup> em resposta às crescentes doses de adiponectina aplicadas aos músculos papilares isolados. Tanto no pico de encurtamento (PS - Figura 42 A) como na tensão ativa (Ta - Figura 42 B) verificou-se uma diminuição gradual com o aumento das concentrações de

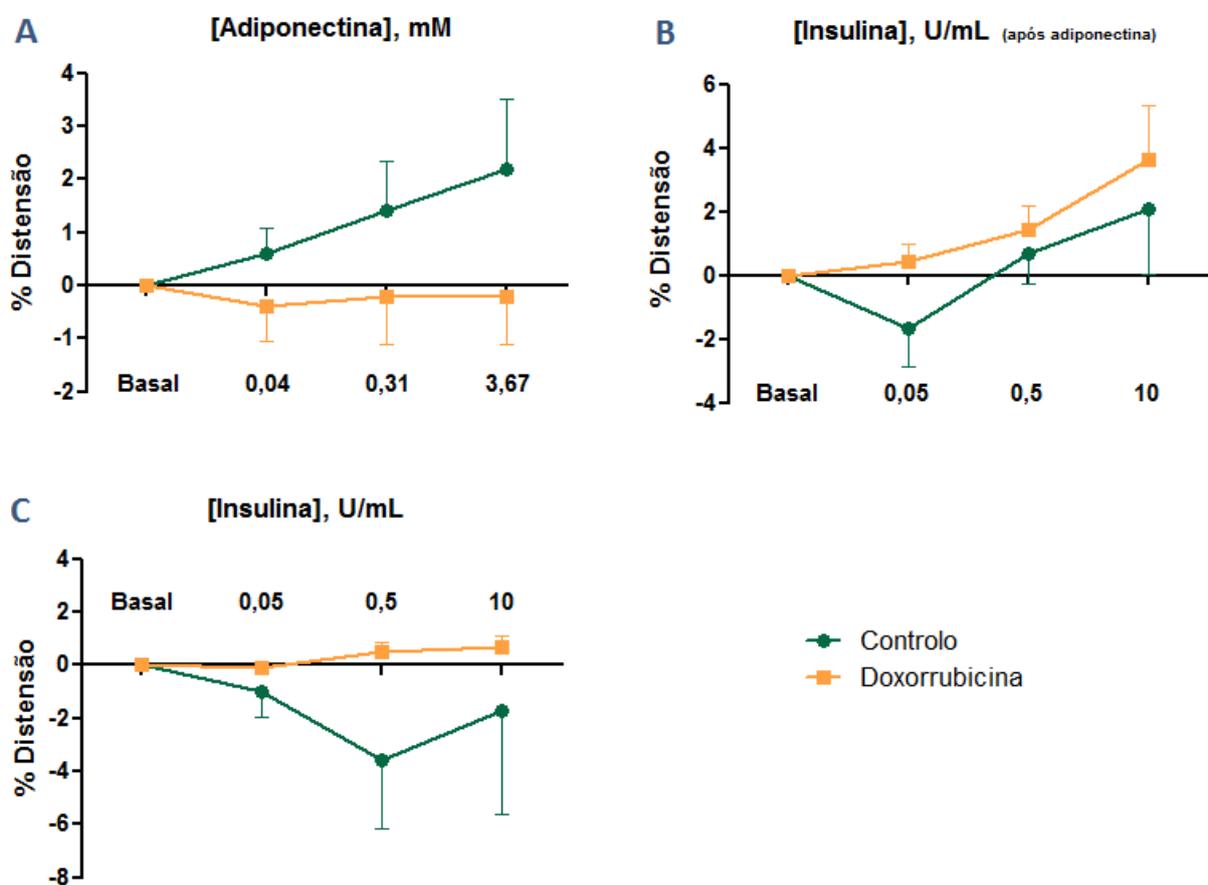
<sup>e</sup> Lusitropismo – relaxamento

adiponectina, sendo que os restantes parâmetros de contractilidade e relaxamento obtidos apresentaram um comportamento semelhante. É de notar que a variação dos parâmetros não foi significativa entre os grupos em estudo, controlo e Doxo. Os gráficos C e D da Figura 42 apresentam a resposta dos músculos às crescentes doses de insulina, após a administração da adiponectina. Como se pode verificar, em ambos os parâmetros de contractilidade, a insulina apresenta um efeito inotrópico negativo, para animais controlo e Doxo. O mesmo efeito foi visualizado nos restantes parâmetros obtidos nas medições isométricas e isotónicas realizadas. A Figura 42 (C,D,E e F) exhibe a resposta dos músculos papilares à aplicação de doses crescentes de insulina. Nos resultados obtidos pela administração de insulina (Figura 42 E e F) verifica-se uma diminuição dos parâmetros PS e AT no grupo Doxo, e no grupo controlo verifica-se um efeito inotrópico positivo para a primeira dose (0,05 U/mL) e depois um efeito negativo.



**Figura 42** - Registo da resposta dos parâmetros de contractilidade e relaxamento em animais controlo e Doxo: ao aumento das concentrações de adiponectina nos parâmetros **(A)** PS, pico de encurtamento, e **(B)** tensão ativa, AT; ao aumento das concentrações de insulina após a administração da adiponectina nos **(C)** PS e **(D)** AT; e ao aumento da concentração da insulina nos **(E)** PS e **(F)** AT. Os valores são apresentados pela média±e.p.m., expressos em percentagem de variação em relação ao registo basal.

Na Figura 43, encontra-se registada a variação da distensão dos músculos papilares em resposta às crescentes doses de (A) adiponectina, (B) insulina, após administração de adiponectina, e (C) insulina, em relação aos valores basais. Como se pode observar, a aplicação de adiponectina e de insulina após esta, fez aumentar a distensibilidade dos músculos controlo, enquanto a insulina provocou a sua diminuição. Para o grupo Doxo, apenas a administração de insulina após a adiponectina apresentou um aumento na variação da distensão. No entanto, as variações apresentadas não são significativamente estatísticas entre os dois grupos em estudo.



**Figura 43** - Efeito da distensibilidade à administração de doses crescentes de **(A)** adiponectina, **(B)** insulina, após adiponectina, e **(C)** insulina. Os valores apresentados encontram-se expressos pela média±e.p.m. em percentagem de variação da distensão do músculo em relação aos valores basais.

### 6.3 ESTUDOS FUNCIONAIS EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

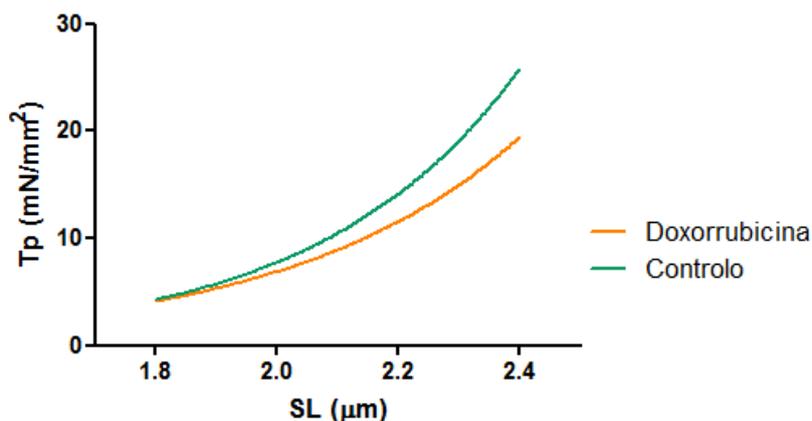
Os resultados das medições de força isométricas realizadas para os grupos controlo e Doxo, bem como as dimensões dos cardiomiócitos, estão registados na Tabela 6. Analisando a tabela, conclui-se valores de força obtidos, como as tensões total (Tt), ativa (Ta) e passiva (Tp), aumentaram ligeiramente, mas sem nenhum significado estatístico.

Adicionalmente, calculou-se a razão entre a tensão passiva e a tensão total (Tp/Tt) e entre a passiva e a ativa (Tp/Ta). Verificou-se que a segunda relação diminuiu consideravelmente no grupo Doxo ( $p=0,0001$ ).

**Tabela 6** - Registo dos parâmetros obtidos nas medições de força em cardiomiócitos controlo e doxorubicina. Foram obtidos os valores para a tensão total, Tt, tensão passiva, Tp, tensão ativa, Ta, todos expressos em  $\text{mN}/\text{mm}^2$ , na solução ativante com  $\text{pCa } 4.5$ . Apresentam-se, também, as relações entre a tensão passiva e a tensão total (Tp/Tt), e entre a tensão passiva e tensão ativa (Tp/Ta). Os valores são apresentados pela média  $\pm$ e.p.m. † indica resultado estatisticamente significativo.

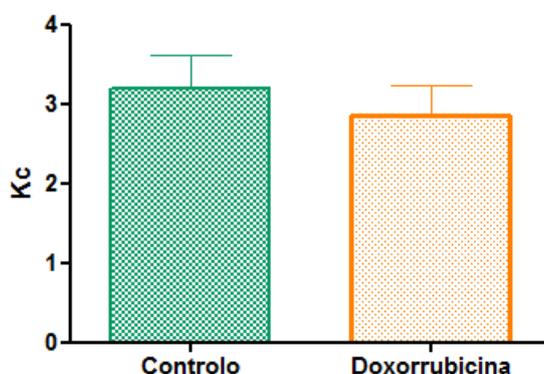
Parâmetros	Controlo (n=34)	Doxo (n=22)
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	80,446 $\pm$ 4,75	85,486 $\pm$ 5,83
Largura ( $\mu\text{m}$ )	28,283 $\pm$ 2,52	29,914 $\pm$ 2,47
Tt ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ )	15,659 $\pm$ 1,39	16,753 $\pm$ 2,16
Tp ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ )	2,419 $\pm$ 0,24	3,428 $\pm$ 0,54
Ta ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ )	13,240 $\pm$ 1,29	13,325 $\pm$ 1,70
Tp/Tt	0,169 $\pm$ 0,02	0,219 $\pm$ 0,02
Tp/Ta	0,104 $\pm$ 0,01	0,037 $\pm$ 0,01 †

Com a realização do estiramento do cardiomiócito, foi possível obter valores de força passiva (Tp) para vários comprimentos de sarcómero (SL). A Figura 44 mostra a relação entre a Tp e o SL para animais controlo e Doxo, com o SL a variar entre os 1,8 e os 2,4  $\mu\text{m}$ . Como se pode observar nesta figura, a tensão passiva para animais Doxo foi sempre menor do que a em animais controlo, para qualquer valor de SL.



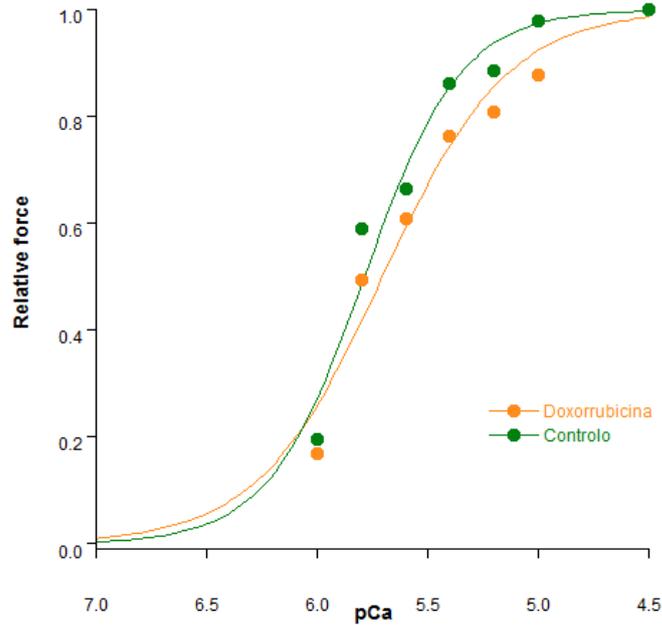
**Figura 44** - Representação gráfica da tensão passiva ( $T_p$ ), dada em  $mN/mm^2$ , em função do comprimento do sarcômero (SL), dado em  $\mu m$ .

Das curvas apresentadas na Figura 44 pode-se extrair parâmetros que possibilitam a avaliação das propriedades elásticas dos cardiomiócitos. É o caso do  $K_c$ , contante de rigidez, que corresponde ao declive da curva  $T_p$ -SL. A diferença deste parâmetro entre cardiomiócitos de animais controle e Doxo é ilustrada na Figura 45. Desta ilustração pode inferir-se que a rigidez das células diminuiu com a administração da doxorubicina, apesar dos resultados não serem significativamente estatísticos.



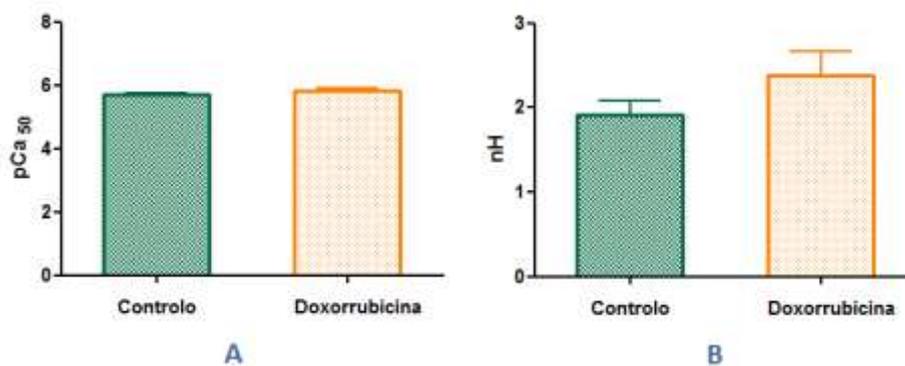
**Figura 45** - Diferença na rigidez dos cardiomiócitos dos animais controle e Doxo através do parâmetro  $K_c$ .

A figura que se segue (Figura 46) apresenta as curvas que relacionam os valores da concentração de cada solução ativante utilizada,  $pCa$ , com a força máxima que o cardiomiócito gerou em cada ativação, relativa à força máxima obtida para a solução saturada de cálcio ( $pCa$  4.5). Esta relação é apresentada para ambos os grupos de animais e verifica-se que não existem diferenças significativas na sensibilidade dos miofilamento para o  $Ca^{2+}$ .



**Figura 46** - Força isométrica relativa dos cardiomiócitos em função do pCa das soluções activantes, para animais controlo e doxorubicina.

Da curva apresentada na figura anterior pode inferir-se parâmetros importantes para a avaliação da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. Na Figura 47 apresenta-se graficamente os valores desses parâmetros obtidos em animais controlo e animais Doxo. O  $pCa_{50}$  (A) corresponde ao valor da concentração de  $Ca^{2+}$  necessário para gerar 50% da força máxima de ativação. O nH, coeficiente nHill (B), corresponde ao declive da curva. Não se verificaram diferenças entre animais controlo e Doxo em ambos os parâmetros.



**Figura 47** - Diferenças da sensibilidade ao cálcio entre animais controlo e Doxo através dos parâmetros: (A)  $pCa_{50}$  e (B) nH.

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 IMPLEMENTAÇÃO DE UM SISTEMA DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

A escolha dos modelos 403A e 315C-I para o transdutor de força e para o controlador de comprimento, respetivamente, assentou em especificações relevantes para a obtenção dos parâmetros desejados: a força do cardiomiócito e a sua sensibilidade ao cálcio.

Os fatores preponderantes para a eleição do modelo 403A, como transdutor de força, foram a sensibilidade e a resolução. Uma resolução de 0,1  $\mu\text{N}$  é razoável para a força adquirida uma vez que se previam valores na ordem dos  $\mu\text{N}$ , como já foi referido no segundo capítulo. Este transdutor possui um bom tempo de resposta, cerca de 1 ms, o que permite detetar rapidamente variações na força quando é alterado o comprimento da célula. Contudo, a variação quer do offset quer do ganho com a temperatura é significativa (0,5  $\mu\text{N}/^\circ\text{C}$  para o offset e 0,01%/ $^\circ\text{C}$  para o ganho), não sendo, portanto, desejável que a temperatura ambiente varie muito durante a realização dos protocolos. Para solucionar este problema, optou-se por manter a temperatura da sala a 20  $^\circ\text{C}$ , embora existam sempre flutuações devido a deslocações de ar.

A fixação da fibra de carbono ao transdutor com parafina confere ao sistema a vantagem de evitar que se quebre quando se exerce força na agulha durante o seu processo de limpeza.

A calibração destes componentes foi executada com o objetivo de garantir o bom funcionamento do equipamento e para a obtenção de resultados mais rigorosos. Os fatores de calibração obtidos (Figura 38), muito próximos do previsto, indicam uma calibração razoável. Após a calibração realizada, era desejável testar o transdutor e ver a sua resposta à sua submissão a uma força conhecida. Foi testado o equipamento com células cardíacas provenientes de ratos, obtendo-se forças entre os 2  $\text{mN}/\text{mm}^2$  e os 12  $\text{mN}/\text{mm}^2$ , e de coelhos, com forças de 2 a 30  $\text{mN}/\text{mm}^2$ , correspondendo ao desenvolvimento de tensões inferiores a 10  $\mu\text{N}$  quando colocados em soluções de cálcio saturadas. Um estudo realizado por *Bluhm et al.* em cardiomiócitos de coelho apresenta valores médios de força a rondar os 5,7  $\text{mN}/\text{mm}^2$ , e faz uma comparação entre outros estudos que exibiram valores de força

inferiores a 7  $\mu\text{N}$  para células cardíacas de vários mamíferos [56]. Outro estudo, realizado por *Nishimura et al.*, no qual realizaram medições em cardiomiócitos do ventrículo de rato, divulga valores de força inferiores a 10  $\mu\text{N}$ , sendo a força máxima 41  $\text{mN}/\text{mm}^2$  em média sob condições isométricas [36]. Uma vez que os valores obtidos se enquadram no que era expectável, foi possível validar a técnica e concluir que o sistema implementado é capaz de realizar as medições necessárias à avaliação da função cardíaca.

O tempo de resposta relativamente baixo (500 ms), que corresponde à rapidez do controlador, bem como a sua alta linearidade (99,5 %) foram fatores decisivos para a escolha deste controlador para integrar o equipamento. Um outro fator de elevada importância foi tido em conta: a complacência diminuta, inferior a 0,01  $\mu\text{m}/\text{mN}$ , que garante que o comprimento de sarcómero ajustado não se alterará devido a movimentos do motor.

Tal como no transdutor, a resolução do controlador, 0,5  $\mu\text{m}$ , é suficiente para alterar o comprimento de cardiomiócitos uma vez que o encurtamento efetuado corresponde a 20% do tamanho inicial ( $L_0$ ) do cardiomiócito, podendo variar entre os 5 e os 30  $\mu\text{m}$ , consoante o  $L_0$ .

O tipo de controlo exercido sobre o motor magnético teve grande influência na escolha e está associado a uma resposta mais rápida ou mais lenta do controlador. Para alcançar tempos de resposta mais rápidos a eletrónica de controlo usa uma malha de controlo proporcional/derivativo (PD) [48].

O sistema de controlo do dispositivo 315C-I inclui um integrador na sua malha de controlo, que o torna num controlador PID. A adição do integrador resulta numa resposta excecionalmente plana e também garante que não há praticamente movimento do braço, independentemente da força aplicada. Em contrapartida, este tipo de controlo aumenta o tempo de resposta do sistema (500 ms) [48]. Encontrou-se, assim, um compromisso entre o tempo de resposta e a estabilidade do braço do motor, permitindo manter um SL sem grandes flutuações.

A interface A/D possui entradas e saídas analógicas de 16bits, podendo o sinal variar entre os -10V e os +10V. A resolução de cada entrada e saída é, então, de cerca de 3 mV. Apesar do deslocamento do braço do motor ser reduzido, uma vez que o encurtamento é na ordem dos  $\mu\text{m}$ , e da tensão detetada pela agulha do transdutor ser, também, diminuta ( $\mu\text{N}$ ), a resolução é suficiente se se tiver em conta o fator de escala de cada dispositivo

(transdutor- 0,5mg/V e controlador – 0,15mm/V). Era possível manter uma boa resolução ( $\approx 78$  mV) se o número de bits diminuísse, por exemplo, para metade (8 bits).

A utilização de micromanipuladores manuais mostrou-se de grande utilidade na manipulação microscópica das células. No entanto, o recurso a joysticks tornou-se importante já que proporcionou movimentos mais finos e precisos, que estavam dificultados com a utilização dos manipuladores manuais. A resolução de cerca de 0,01  $\mu\text{m}$  revelou-se adequada ao ajustamento do comprimento do sarcómero, uma vez que no processo de estiramento era necessário alongar a célula cerca de 0,2  $\mu\text{m}$  entre cada SL pretendido.

Uma das grandes vantagens do programa ASI 600A, além da aquisição dos dados, é a possibilidade de controlar o comprimento do cardiomiócito pelo envio de informação ao controlador. Através de funções predefinidas, este programa permite, de uma forma simples e intuitiva, criar protocolos que possibilitam, por exemplo, tornar o processo de encurtamento automático.

Muitos ajustes foram feitos no protocolo até se encontrar a versão final. Uma vez que o comportamento do cardiomiócito é variável quando colocado em solução ativante, ou seja, o tempo até se atingir a força máxima desenvolvida varia de acordo com a concentração de cálcio usada, não foi possível automatizar todo o processo experimental. Optou-se por iniciar manualmente o protocolo quando se atingisse a ativação máxima em cada solução ativante.

A geração de força quase simultânea com a variação de comprimento, em cada uma das soluções (relaxamento, pCa 9.0, e ativante, pCa 4.5-6.0), permite concluir que o controlador de movimento atuou com elevada rapidez, confirmando a boa escolha do controlador. Por medições do comprimento das células, aquando do seu encurtamento em 20%, foi possível confirmar que o braço do motor se moveu a distância desejada, confirmando a eficácia do controlo PID deste controlador.

Uma das fases mais críticas durante o procedimento experimental no estudo de células cardíacas isoladas é a sua fixação às agulhas do transdutor e do motor. O processo de colagem foi realizado com sucesso na maior parte das células escolhidas, embora esteja muito dependente da qualidade da extração celular obtida.

A monitorização do comprimento do sarcómero ao longo da experiência permite verificar se há variações do comprimento. A baixa variação verificada nos ensaios realizados indica uma boa fixação da célula, e uma baixa complacência dos componentes mecânicos.

Apesar do programa permitir, igualmente, uma monitorização automática do comprimento do sarcómero (SL) a partir da imagem obtida em tempo real, não foi possível implementar um protocolo com base nestes pressupostos. Para que isso fosse possível a estriação do cardiomiócito teria de ser uniforme, o que nem sempre acontece devido à inconstante qualidade das preparações celulares, sendo portanto necessário uma otimização deste processo.

Para o cálculo do valor de SL recorreu-se, preferencialmente, ao ACF pois é o mais robusto e eficaz dos algoritmos disponibilizados pelo programa VSL 900B. Com esta técnica a resolução da medição não depende do tamanho da ROI nem do número de ciclos da ROI. No entanto, o algoritmo da FFT possui a vantagem de um tempo de processamento mais rápido, permitindo medições a um ritmo mais elevado do que com os outros algoritmos [52].

## 7.2 ESTUDOS FUNCIONAIS EM MÚSCULOS PAPILARES

Inicialmente é necessário preparar os músculos papilares. Neste tipo de preparação, os músculos papilares do ventrículo direito são os mais utilizados, dado que são mais finos e mais alongados, o que permite obter uma melhor performance durante a experiência sem que os cardiomiócitos mais internos sofram privação de oxigénio (core hipóxico). Por este motivo, as preparações são oxigenadas e mantidas por difusão. Se o músculo for mais grosso, é provável que o seu interior entre em isquemia [28].

A doxorubicina é um fármaco quimioterapêutico de elevada eficácia no combate de vários tipos de cancro [57, 58]. No entanto, a sua utilidade clínica é limitada uma vez que provoca uma toxicidade cardíaca cumulativa dependente da dose, caracterizada por uma cardiomiopatia dilatada irreversível e insuficiência crónica [58-60].

Os animais Doxo demonstraram uma diminuição significativa do seu peso corporal sugerindo caquexia nestes animais. De facto, vários estudos mostram o declínio de peso corporal em animais sujeito ao tratamento crónico por doxorubicina, revelando a sua severidade [61, 62]. O peso dos corações extraídos não variou significativamente entre ambos os grupos, apesar da existência de uma ligeira diminuição no grupo Doxo. No entanto, um estudo realizado por *Koti et al.* mostra um aumento significativo desse peso em ratos [63]. Já um estudo realizado em coelhos, sujeitos à administração de doxorubicina,

relata que o peso dos corações varia com a severidade da cardiomiopatia provocada. Este estudo mostra mesmo que, para estados de baixa severidade, o peso do coração pode variar muito pouco [59].

Apesar de no presente estudo não ter sido efetuada nenhuma modificação do teor de gordura da dieta dos animais estudados, estudos experimentais revelam que ratos com obesidade, induzida por dietas com alto teor de gordura, apresentam maior sensibilidade à toxicidade induzida pela doxorrubicina. No entanto, o mecanismo associado a este estado permanece desconhecido [64].

A adiponectina é uma hormona produzida, exclusivamente, pelo tecido adiposo, e os seus níveis plasmáticos estão diminuídos em indivíduos obesos. Esta adipocina está diminuída quando surgem distúrbios como a hipertensão, diabetes tipo II ou doenças coronárias. Todas estas observações indicam que a adiponectina possui uma função cardioprotetora no desenvolvimento de doenças cardíacas [64]. Estudos mostram que a adiponectina possui um papel protetor, também, em cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina [65, 66].

O efeito inotrópico negativo obtido após administração aguda de adiponectina nos músculos papilares contrasta com o que era esperado e com estudos que concluem uma melhoria da função contráctil com a administração da adiponectina. Isto pode dever-se ao facto da ligação desta adipocina aos seus recetores no coração ter desencadeado a ativação da proteína G [66]. Esta proteína inibe a produção de AMPc, e portanto diminui a concentração de cálcio intracelular disponível. A menor quantidade de cálcio disponível compromete o desempenho da máquina contráctil do músculo.

Vários estudos indicam que a insulina possui um efeito inotrópico positivo [67]. Contudo os resultados obtidos no presente trabalho são apoiados por um estudo realizado por *Hsu et al.* que revela que a insulina apresenta dois efeitos inotrópicos: para baixas concentrações (10 a 1000 nmol/L) tem efeito positivo e para concentrações mais elevadas ( $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ ) possuiu um efeito negativo [68].

Apesar de não serem significativos, a resposta à administração de insulina para o grupo controlo assemelha-se ao de *Hsu et al.*. No entanto, os restantes valores obtidos contrariam o que era esperado.

A resistência à insulina patente na patologia cardiovascular está associada a alterações do metabolismo. A adiponectina tem sido descrita como uma proteína

sensibilizadora da insulina, uma vez que existem estudos que a associam à diminuição de glucose no plasma, independentemente das alterações dos níveis de insulina [69]. Torna-se, então, de elevada importância o estudo dos efeitos na contractilidade da insulina em associação com a adiponectina.

Era de esperar que, uma vez sensibilizadora, a adiponectina aumentasse os efeitos da insulina, que se esperaria ser inotrópica positiva. Isto pode dever-se ao facto da adiponectina poder diminuir a fosforilação dos recetores da insulina (IRS-1), como mostra um estudo realizado por *Zhu et al.*, realizado em ratos [70]. Segundo esta hipótese o comportamento do músculo em resposta à insulina é explicado pelo facto da ligação da insulina ao seu recetor estar diminuída na presença de adiponectina, o que inibe o seu efeito inotrópico positivo.

A cardiomiopatia dilatada induzida pela doxorubicina é caracterizada pelo aumento dos ventrículos, pela diminuição da contractilidade e pelo aumento do relaxamento das paredes ventriculares [1].

De facto, o aumento da distensão era esperado já que vários estudos demonstram que esta hormona inibe a hipertrofia ventricular, contrariando desta forma a diminuição da distensibilidade a ela associada. Em músculos do grupo Doxo, a adiponectina parece confirmar o seu efeito protetor na cardiomiopatia induzida, uma vez que a distensibilidade não alterou ao longo das doses.

Pelo efeito inotrópico positivo atribuído à insulina, esperar-se-ia que a insulina aumentasse a distensibilidade do músculo. Pelo contrário, observou-se um efeito lusitrópico negativo em controlo, para as doses mais baixas, e um aumento da distensibilidade para a dose mais elevada, consistente com o efeito inotrópico já demonstrado. Em animais Doxo, a distensibilidade quase não variou, tal como acontecera com os parâmetros de contractilidade, mostrando que o efeito lusitrópico negativo esperado anulou o efeito positivo atribuído à doxorubicina.

Quando a insulina foi administrada após a adiponectina, a distensibilidade aumentou em ambos os grupos, ainda que ligeiramente (Figura 43 C). Na realidade, estudos prévios já demonstraram que a relação entre a adiponectina e a insulina pode ser influenciada por fatores genéticos, ainda desconhecidos [69].

### 7.3 ESTUDOS FUNCIONAIS EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS

As células utilizadas neste estudo provêm, normalmente, de biópsias de tecido cardíaco animal ou humano e o seu isolamento é feito de forma mecânica. Depois do isolamento, os cardiomiócitos são tratados com Triton X-100 para remover todas as barreiras membranares, mantendo o aparelho contrátil intacto. Este método é vantajoso na medida em que possibilita o estudo da correlação entre as propriedades contráteis e a composição de proteínas sob condições estandardizadas (composição do meio intracelular, comprimento do sarcómero), sem a presença de fatores perturbadores presentes no coração intacto (fatores hormonais e concentrações de cálcio variáveis) [6].

As forças desenvolvidas pelos músculos estriados são, normalmente, classificadas em ativa, componente gerada pelas proteínas contráteis, e em passiva, componente gerada pelos elementos elásticos que possibilitam o estiramento do músculo. Existem duas estruturas responsáveis pela força passiva: a rede de colagénio na MEC e os filamentos de titina [71]. Nos cardiomiócitos isolados, a principal fonte de tensão passiva é a titina. À medida que o sarcómero vai alongando os seus segmentos extensíveis vão desenvolvendo força elástica [72].

Os resultados obtidos no estiramento dos cardiomiócitos revelam que não há diferenças significativas na relação tensão passiva – comprimento do sarcómero entre os dois grupos em estudo: animais normais e com IC. No entanto, verifica-se uma ligeira diminuição da tensão passiva e da rigidez dos cardiomiócitos para o grupo Doxo (Figura 45). Estes resultados são concordantes com o que se esperava teoricamente, já que doxorrubina induz uma cardiomiopatia dilatada. Deste modo o coração torna-se mais complacente e, conseqüentemente, a sua capacidade de enchimento reduz.

Vários estudos apontam para a diminuição da quantidade de titina em corações com insuficiência cardíaca dilatada [72], podendo esta variação estar relacionada com a diminuição da rigidez apresentada pelas células.

Os valores força foram normalizados à área seccional da célula, que se considerou elíptica e com o diâmetro menor igual a 70% da largura da célula. O facto de existirem estas considerações, uma vez que ainda não é possível concretizar medições em profundidade, pode influenciar os resultados obtidos para estes valores de força.

As forças total (Tt), passiva (Tp) e ativa (Ta) não variaram significativamente entre os grupos controlo e Doxo, tal como aconteceu no estudo com músculos papilares isolados. Todavia, a relação entre as tensões passiva e ativa diminuiu significativamente no grupo Doxo, devido principalmente por influência da Tp, que diminuiu. Este facto é concordante com o esperado, já que o tratamento por doxorubicina resulta numa cardiomiopatia dilatada, cujo miocárdio apresenta uma diminuição da rigidez, como já foi referido.

Comparando, agora, os resultados obtidos pelos dois métodos de avaliação da função contráctil cardíaca, mais precisamente a tensão ativa em ambos os processos, conclui-se que no protocolo do músculo papilar isolado (Tabela 5) os valores foram bastante mais elevados do que os do protocolo dos cardiomiócitos isolados (Tabela 6). Este resultado foi obtido, igualmente, por outro grupo de investigadores que, tal como neste estudo, consideraram a área seccional do cardiomiócito como uma elipse [34]. Esta consideração pode ser, realmente, um erro introduzido na análise de dados. Adicionalmente outros fatores podem contribuir para os valores menores obtidos na avaliação funcional de cardiomiócitos isolados tais como: 1) a diferença da concentração de  $Ca^{2+}$  nas diferentes soluções; 2) o recurso a material fresco versus material congelado; 3) a utilização de temperaturas fisiológica de 35°C versus temperaturas sub-fisiológicas de 20°C. No que diz respeito à Tp verificou-se igualmente que os valores da avaliação funcional em cardiomiócitos isolados são ligeiramente inferiores aos valores obtidos em músculos papilares já que, neste último outros fatores contribuem para a rigidez miocárdica como a matriz extracelular.

## 8 CONCLUSÃO

Do trabalho realizado pode concluir-se que:

1. A indução de cardiotoxicidade e insuficiência cardíaca pela doxorubicina, uma droga antineoplásica, foi confirmada pela diminuição significativa do peso corporal dos coelhos em relação aos animais normais.
2. O estudo realizado em preparações multicelulares *in vivo*, utilizando músculos papilares, não revelou diferenças significativas nos parâmetros de contractilidade e relaxamento entre coelhos normais e coelhos com insuficiência cardíaca. A força isométrica média medida em 33 músculos papilares foi cerca de  $33 \text{ mN/mm}^2$ , para ambos os grupos de estudo.
3. As respostas inotrópica negativa e lusitrópica positiva às crescentes doses de adiponectina e insulina faz supor que a cardiomiopatia provocada pela doxorubicina influencia a atuação dos fármacos. Verificou-se, porém, que o efeito da insulina é dependente da concentração da dose administrada.
4. Conclui-se também que poderá haver uma interação entre a adiponectina e a insulina que influencie o comportamento da insulina, quando esta é administrada após a adiponectina.
5. Tal como no estudo do músculo isolado, a avaliação da função contráctil nos cardiomiócitos não apresentou diferenças significativas entre corações normais e corações insuficientes, o que veio reforçar os resultados obtidos anteriormente. No entanto, a diminuição da tensão passiva relativamente à tensão ativa verificada em animais Doxo, sugere uma cardiomiopatia dilatada, como era previsto com a indução deste fármaco.
6. O estiramento realizado aos cardiomiócitos permitiu avaliar as propriedades passivas, e os resultados indicaram que houve uma ligeira diminuição da rigidez das células dos animais Doxo em relação aos controlos.
7. O sistema de avaliação funcional de cardiomiócitos isolados foi implementado com sucesso, garantindo-se e confirmando-se o bom funcionamento de todos os componentes integrados no sistema. Esta implementação possibilitou o estudo da contractilidade em células cardíacas provenientes dos coelhos acima referidos.

8. A força isométrica média de 56 cardiomiócitos foi de 15,7 mN/mm<sup>2</sup> para o grupo controlo (n=34) e de 16,8 mN/mm<sup>2</sup> para o grupo Doxo (n=22).
9. A resolução (0,1 µN) e o tempo de resposta (1 ms) do transdutor de força, escolhido para integrar o sistema, foram adequados à aquisição dos parâmetros de força. No entanto, a temperatura influencia significativamente a variação do offset (0,5 µN/°C), sendo necessário manter uma temperatura constante ao longo dos protocolos.
10. O tipo de controlo selecionado para alterar o comprimento dos cardiomiócitos – controlo PID – revelou-se uma escolha acertada dado que confere uma boa estabilidade ao braço do motor e possui um tempo de resposta relativamente baixo (500 ms). A sua resolução (0,5 µm) foi adequada às variações de comprimento provocadas.
11. O sistema implementado revelou-se uma opção útil na medida em permitiu monitorizar o comprimento do sarcómero, aplicar protocolos de acordo com as medições a realizar e obter parâmetros de força que permitiram a avaliação das propriedades mecânicas dos cardiomiócitos.
12. A implementação do sistema realizada abre novos caminhos para a avaliação da contractilidade, podendo-se assumir uma grande importância no diagnóstico e estudo de doenças cardíacas ao nível celular. A simplicidade na criação de diferentes protocolos de medição da força permitirá estudos mais alargados dos mecanismos contrácteis das células, inclusive em biopsias humanas.

## 8.1 PERSPETIVAS FUTURAS

Em trabalhos futuros, será importante a realização de estudos moleculares para compreender melhor os efeitos da adiponectina e da insulina no sistema cardiovascular.

No sistema de medição de força implementado, a colocação de uma fonte de luz e um espelho ao nível do cardiomiócito colado, no microscópio, permitirá uma medida mais exata da profundidade e observar com rigor a forma da secção da célula, eliminando os erros associados à normalização dos valores de força desenvolvida.

No programa ASI 600A, será de grande utilidade o desenvolvimento de protocolos que permitam o controlar o comprimento do sarcómero, de modo a automatizar o processo de estiramento das células.

A existência de vários poços disponíveis no dispositivo de teste, torna possível a aplicação de fármacos nos cardiomiócitos isolados, o que facilitará a investigação do comportamento das proteínas contrácteis, como a titina, e concluir mais acerca das propriedades mecânicas e energéticas das células.

Em estudos futuros, a fim de reduzir o erro padrão associado às medições realizadas, será necessário aumentar o número de amostras utilizada em cada experiência.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Alcalai, *et al.*, "Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics," *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 19, pp. 104-110, Jan 2008.
- [2] M. Seixas-Cambão, Leite-Moreira, Adelino F. (2009) Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca Crónica. *Revista Portuguesa de Cardiologia* [Review]. 439-71.
- [3] B. Barry G, "Chapter 30 - Cardiac Failure," in *Pediatrics*, M. O. Lucy, *et al.*, Eds., ed Philadelphia: Mosby, 2005, pp. 258-264.
- [4] J. A. Towbin and N. E. Bowles, "The failing heart," *Nature*, vol. 415, pp. 227-33, Jan 10 2002.
- [5] J. Martins and W. Martins. (2010) The use of echocardiography in the evaluation of adriamycin cardiotoxicity. *Experts in Ultrasound: Reviews and Perspectives*.
- [6] J. van der Velden, *et al.*, "Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue," *Cardiovasc Res*, vol. 38, pp. 414-23, May 1998.
- [7] A. Davies, *et al.*, *Human physiology*: Churchill Livingstone, 2001.
- [8] W. Contributors, *Human Physiology*: Blackwell River.
- [9] S. Fox, "Blood, heart and circulation.," in *Human Physiology* P. Hall, Ed., ed New York, 2008.
- [10] L. Cox, *et al.*, "A broken heart: a stretch too far: an overview of mouse models with mutations in stretch-sensor components," *Int J Cardiol*, vol. 131, pp. 33-44, Dec 17 2008.
- [11] R. Berne, Levy, Matthew, *Principles of Physiology*, Second ed. Missouri, 1996.
- [12] R. E. Klabunde, *Cardiovascular physiology concepts*: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [13] J. G. Bronzwaer and W. J. Paulus, "Matrix, cytoskeleton, or myofilaments: which one to blame for diastolic left ventricular dysfunction?," *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 47, pp. 276-84, Jan-Feb 2005.
- [14] K. A. Clark, *et al.*, "Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function," *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 18, pp. 637-706, 2002.
- [15] J. C. Ruegg, "Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments," *Naturwissenschaften*, vol. 85, pp. 575-82, Dec 1998.
- [16] D. M. Bers, "Cardiac excitation-contraction coupling," *Nature*, vol. 415, pp. 198-205, Jan 10 2002.
- [17] W. C. Little, "Assessment of Normal and Abnormal Cardiac Function," in *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed: Saunders, 2001.
- [18] A. Leite-Moreira, "Determinantes da Função Cardíaca Sistólica," ed. Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2001.
- [19] T. J. J. Blanck and D. L. Lee, "Cardiac Physiology," in *Scientific Principles*, C. Livingstone, Ed., ed, 2000.
- [20] N. J. Fortuin and C. G. K. Pawsey, "The evaluation of left ventricular function by echocardiography," *The American Journal of Medicine*, vol. 63, pp. 1-9, 1977.
- [21] S. F. Nagueh and P. J. Peters, "Echocardiography," in *Critical care medicine: principles of diagnosis and management in the adult*. vol. 1, ed: Mosby, 2001.
- [22] J. G. Webster, *The measurement, instrumentation, and sensors handbook*: CRC Press, 1999.

- [23] C. Silva, *et al.*, "Normatização dos Equipamentos e Técnicas de Exame para Realização de Exames Ecocardiográficos," *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 82, pp. 1-10, 2004.
- [24] A. F. Leite-Moreira, "Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure," *Heart*, vol. 92, pp. 712-8, May 2006.
- [25] K. Brandis, "Cardiovascular Physiology," in *The Physiology Viva*, ed: Kerry Brandis, 2003.
- [26] O. M. Gomes, *Fisiologia Cardiovascular Aplicada*. Belo Horizonte 2005.
- [27] L. J. Mellors and C. J. Barclay, "The energetics of rat papillary muscles undergoing realistic strain patterns," *J Exp Biol*, vol. 204, pp. 3765-77, Nov 2001.
- [28] S. Dhein, *et al.*, *Practical methods in cardiovascular research*: Springer, 2005.
- [29] B. R. Jewell and J. M. Rovell, "Influence of previous mechanical events on the contractility of isolated cat papillary muscle," *J Physiol*, vol. 235, pp. 715-40, Dec 1973.
- [30] W. A. Linke, *et al.*, "Passive and active tension in single cardiac myofibrils," *Biophys J*, vol. 67, pp. 782-92, Aug 1994.
- [31] D. Torres Barba and P. Paolini. (2009, A Non-Invasive Method for Measuring Contractility in Cardiocytes. *Access Proceedings*.
- [32] J. Huang, *et al.*, "Study on mechanical interactions between single cardiac myocyte and elastic substrate.," *Acta Mechanica Solida Sinica*, vol. 22, 6 December 2009 2009.
- [33] A. J. Brady, "Mechanical properties of isolated cardiac myocytes," *Physiol Rev*, vol. 71, pp. 413-28, Apr 1991.
- [34] G. Iribe, *et al.*, "Force-length relations in isolated intact cardiomyocytes subjected to dynamic changes in mechanical load," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 292, pp. H1487-97, Mar 2007.
- [35] J. Y. Le Guennec, *et al.*, "A new method of attachment of isolated mammalian ventricular myocytes for tension recording: Length dependence of passive and active tension," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 22, pp. 1083-1093, 1990.
- [36] S. Nishimura, *et al.*, "Single cell mechanics of rat cardiomyocytes under isometric, unloaded, and physiologically loaded conditions," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 287, pp. H196-202, Jul 2004.
- [37] S. I. Yasuda, *et al.*, "A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 281, pp. H1442-6, Sep 2001.
- [38] J. van der Velden, *et al.*, "Isometric tension development and its calcium sensitivity in skinned myocyte-sized preparations from different regions of the human heart," *Cardiovasc Res*, vol. 42, pp. 706-19, Jun 1999.
- [39] S. Park, *et al.*, "Contractile force measurements of cardiac myocytes using a micro-manipulation system," presented at the Intelligent Robots and Systems, Seoul, Korea, 2005.
- [40] S. Yin, *et al.*, "Measuring single cardiac myocyte contractile force via moving a magnetic bead," *Biophys J*, vol. 88, pp. 1489-95, Feb 2005.
- [41] G. Lin, *et al.*, "Miniature heart cell force transducer system implemented in MEMS technology," *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 48, pp. 996-1006, Sep 2001.
- [42] ASI, "Instruction Manual - Model 403A Force Transducer Systems ", ed, 2007.
- [43] D. M. Ștefănescu, *Handbook of Force Transducers: Principles and Components*: Springer, 2011.

- [44] M. G. Joshi, *Compr. Transducers for Instrumentation*: Laxmi Publications, 2005.
- [45] L. K. Baxter, *Capacitive Sensors: Design and Applications*: IEEE Press, 1996.
- [46] L. Precision. (2011, Capacitive Sensor Operation and Optimization. *TechNote*. Available: [www.lionprecision.com](http://www.lionprecision.com)
- [47] ASI, "Instruction Manual - Model 315C-I High-Speed Length Controllers ", ed, 2008.
- [48] C. T. Kilian, *Modern control technology: components and systems*: Delmar/Thomson Learning, 2005.
- [49] R. Burns, *Advanced control engineering*: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [50] A. Visioli, *Practical PID control*: Springer, 2006.
- [51] ASI, "Instruction Manual - Model 600A Digital Controller," ed, 2010.
- [52] ASI, "Instruction Manual - Model 900A Video Sarcomere Length Program," ed, 2004.
- [53] P. F. Dunn, *Measurement and data analysis for engineering and science*: CRC Press/Taylor & Francis, 2010.
- [54] A. J. Marian, "On mice, rabbits, and human heart failure," *Circulation*, vol. 111, pp. 2276-9, May 10 2005.
- [55] M. D. Calasans-Maia, *et al.*, "The rabbit as an animal model for experimental surgery," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 24, pp. 325-328, 2009.
- [56] W. F. Bluhm, *et al.*, "Active force in rabbit ventricular myocytes," *J Biomech*, vol. 28, pp. 1119-22, Sep 1995.
- [57] S. Zhou, *et al.*, "Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 771-7, Jan 15 2001.
- [58] R. D. Olson, *et al.*, "Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, pp. 3585-9, May 1988.
- [59] D. A. Dodd, *et al.*, "Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model," *J Clin Invest*, vol. 91, pp. 1697-705, Apr 1993.
- [60] G. Takemura and H. Fujiwara, "Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management," *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 49, pp. 330-52, Mar-Apr 2007.
- [61] E. H. Herman, *et al.*, "Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 92, pp. 42-53, Jan 1988.
- [62] I. Klimtova, *et al.*, "Comparative study of chronic toxic effects of daunorubicin and doxorubicin in rabbits," *Hum Exp Toxicol*, vol. 21, pp. 649-57, Dec 2002.
- [63] B. C. Koti, *et al.*, "Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicin induced myocardial toxicity in albino rats," *Indian J Exp Biol*, vol. 47, pp. 41-6, Jan 2009.
- [64] S. Maruyama, *et al.*, "Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism," *J Biol Chem*, vol. 286, pp. 32790-800, Sep 16 2011.
- [65] M. Konishi, *et al.*, "Adiponectin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by anti-apoptotic effects through AMPK up-regulation," *Cardiovasc Res*, vol. 89, pp. 309-19, Feb 1 2011.
- [66] A. El-Armouche, *et al.*, "Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure," *Cardiovasc Res*, vol. 60, pp. 478-87, Dec 1 2003.

- [67] D. von Lewinski, *et al.*, "Insulin causes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-dependent and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-independent positive inotropic effects in failing human myocardium," *Circulation*, vol. 111, pp. 2588-95, May 24 2005.
- [68] C. H. Hsu, *et al.*, "Letter regarding article by von Lewinski et al, "Insulin causes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-dependent and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-independent positive inotropic effects in failing human myocardium"," *Circulation*, vol. 112, p. e367; author reply e367, Dec 20 2005.
- [69] T. A. Hopkins, *et al.*, "Adiponectin actions in the cardiovascular system," *Cardiovasc Res*, vol. 74, pp. 11-8, Apr 1 2007.
- [70] B. Zhu, *et al.*, "[Adiponectin decreases insulin receptor substrate-1 phosphorylation in the liver of OLETF rats possibly through nuclear factor-kappaB signaling pathway]," *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, vol. 31, pp. 782-6, May 2011.
- [71] W. A. Linke and M. Kruger, "The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways," *Physiology (Bethesda)*, vol. 25, pp. 186-98, Jun 2010.
- [72] M. M. LeWinter, "Titin isoforms in heart failure: are there benefits to supersizing?," *Circulation*, vol. 110, pp. 109-11, Jul 13 2004.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – FUNÇÕES DO PROGRAMA ASI 600A

<b>Função</b>	<b>Descrição</b>
<b>Data-Enable</b>	Inicia a aquisição de dados
<b>Data-Disable</b>	Termina a aquisição de dados
<b>Length-Step</b>	Alteração do comprimento em forma de degrau
<b>Length-Ramp</b>	Alteração do comprimento em forma de rampa
<b>Length-Square</b>	Alteração do comprimento usando uma onda quadrada
<b>Length-Sine</b>	Alteração do comprimento usando uma onda sinusoidal
<b>Length-Sample</b>	Armazenamento da amostra com o valor de comprimento após um atraso especificado
<b>Length-Hold</b>	Alteração do comprimento em forma de degrau para o valor de comprimento armazenado no número da amostra especificado
<b>SL-Step</b>	Alteração do comprimento do sarcômero em forma de degrau
<b>SL-Ramp</b>	Alteração do comprimento do sarcômero em forma de rampa
<b>SL-Sample</b>	Armazenamento da amostra com o valor de comprimento do sarcômero após um atraso especificado
<b>SL-Hold</b>	Alteração do comprimento do sarcômero em forma de degrau para o valor de comprimento armazenado no número da amostra especificado
<b>Repeat</b>	Repetir o protocolo o número de vezes desejado
<b>Stop</b>	Terminar protocolo

## APÊNDICE 2 – PROTOCOLO DE ESTIRAMENTO

```
ASI 600A Test Protocol File
Created: Sun Jul 17 08:40:02 2011
A/D Sampling Rate: 2000 Hz
Comment: Isometric Force Protocol
Minimum Length: -5.000 (Lo)
Maximum Length: 5.000 (Lo)
PD Deadband:      0.000000 mN
Stimulus 01: 0.3 ms 100.000 Hz 10.0 ms 50.000 Hz 0.100 s
Stimulus 02: 1.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 03: 1.3 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 04: 1.4 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 05: 1.5 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 06: 1.6 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 07: 1.7 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 08: 1.8 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 09: 1.9 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 10: 2.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Time (ms)  Control Function Options
      0.0  Data-Enable
    5000.0  Data-Disable
      0.0  Stop
```

```
ASI 600A Test Protocol Sequence File
Created: Fri Jul 23 09:47:21 2011
Protocol File Directory: /home/asi/pro/
Data File Directory: /home/asi/data/
Output File Type (0: one file 1: one file per frame): 0
Protocol 1: 1 0 0 0 prot_SL 1.6_
Protocol 2: 1 0 0 0 prot_SL 1.8_
Protocol 3: 1 0 0 0 prot_SL 2.0_
Protocol 4: 1 0 0 0 prot_SL 2.2_
Protocol 5: 1 0 0 0 prot_SL 2.4_
```

### APÊNDICE 3 – PROTOCOLO DE MEDIÇÃO DE FORÇA

ASI 600A Test Protocol File  
Created: Sun Jul 17 07:39:29 2011  
A/D Sampling Rate: 2000 Hz  
Comment: Isometric Force Protocol  
Minimum Length: -5.000 (Lo)  
Maximum Length: 5.000 (Lo)  
PD Deadband: 0.000000 mN  
Stimulus 01: 0.3 ms 100.000 Hz 10.0 ms 50.000 Hz 0.100 s  
Stimulus 02: 1.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 03: 1.3 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 04: 1.4 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 05: 1.5 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 06: 1.6 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 07: 1.7 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 08: 1.8 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 09: 1.9 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s  
Stimulus 10: 2.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s

Time (ms)	Control Function	Options
0.0	Data-Enable	
1000.0	Length-Step	0.8 Lo
1005.0	Length-Step	1 Lo
11002.0	Length-Step	0.8 Lo
21002.0	Length-Step	1 Lo
31002.0	Data-Disable	
0.0	Stop	

ASI 600A Test Protocol Sequence File  
Created: Fri Jul 29 07:41:54 2011  
Protocol File Directory: /home/asi/pro/  
Data File Directory: /home/asi/data/  
Output File Type (0: one file 1: one file per frame): 0

Protocol 1:	0	3	0	0	prot_SL	Slength
Protocol 2:	1	0	0	0	protocolo_2	4.5(1)_
Protocol 3:	1	0	0	0	protocolo_2	4.5(2)_
Protocol 4:	1	0	0	0	protocolo_2	5.2_
Protocol 5:	1	0	0	0	protocolo_2	5.6_
Protocol 6:	1	0	0	0	protocolo_2	6.0_
Protocol 7:	1	0	0	0	protocolo_2	5.0_
Protocol 8:	1	0	0	0	protocolo_2	5.4_
Protocol 9:	1	0	0	0	protocolo_2	5.8_
Protocol 10:	1	0	0	0	protocolo_2	4.5(3)_

## APÊNDICE 4 – FICHEIRO DE DADOS

ASI 600A Data File  
Created: Sat Jul 23 08:44:05 2011  
A/D Sampling Rate: 2000 Hz  
Comment: test force step #1 GF=0.9 DF=0.0  
\*\*\* Setup Parameters \*\*\*  
Length Controller: 315C  
Force Transducer: 403A  
Initial Length: 0.091 mm  
Minimum Length: -5 Lo  
Maximum Length: 5 Lo  
Fiber Length: 0.091 mm  
Initial Sarcomere Length: 2.2 um  
Diameter: 0.0261151 mm  
Maximum Tetanic Tension: 2 mN  
PD Deadband: 0.0005 mN  
ADC0 Offset: 0.000 mv  
ADC1 Offset: 0.000 mv  
DAC0 Offset: 0.000 mv  
DAC1 Offset: 0.000 mv  
Panel 1 size: 4  
Panel 2 size: 2  
Panel 3 size: 2  
Panel 4 size: 0  
Panel 1 signal: 1  
Panel 2 signal: 0  
Panel 3 signal: 2  
Panel 4 signal: 6  
Length Units: um  
Force Units: mN  
Time Units: ms  
Sarcomere Length Units: um  
Scope Display1: 2  
Scope Display2: 0  
Scope Timebase: 3  
Scope Vscale: 0  
Scope Lunit: 2  
Scope Lmin: 0.948000  
Scope Lmax: 0.956000  
Scope Funit: 0  
Scope Fmin: 0.000000  
Scope Fmax: 1.000000  
Scope Sunit: 1  
Analysis Lunit: 2  
Analysis Funit: 0  
Analysis Tunit: 1  
Analysis Color1: 1  
Analysis Color2: 2  
Analysis Channels: 10100000000001  
Aux1 Name: Aux1  
Aux1 Units: volts  
Aux1 Scale (units/volt): 1.000000  
Aux1 Offset (units): 0.000000  
Aux2 Name: Aux2  
Aux2 Units: mv

```

Aux2 Scale (units/volt): 1000
Aux2 Offset (units): 0
*** Calibration Parameters ***
Model  LOffset  LOfscale  LIOffset  LIscale  FOffset  FOfscale
FIOffset FIScale
Number      mm          mm/v          mm          mm/v          mN           mN/v
mN          mN/v
308B  0      0.2  0      0.2  0      1      0      1
312C  0      0.15 0      0.15 0      1      0      1
315C  0      0.15 0      0.15 0      1      0      1
318B  0      0.3  0      0.3  0      1      0      1
322C  0      0.3  0      0.3  0      1      0      1
300B  0      0.5  0      0.5  0      50     0      50
300B-LR  0      0.5  0      0.5  0      100    0      100
305B  0      1      0      1      0      500    0      500
305B-LR  0      1      0      1      0      1000   0      1000
309B  0      1.25 0      1.25 0      2000   0      2000
310B  0      2      0      2      0      5000   0      5000
310B-LR  0      2      0      2      0      10000  0      10000
400A  0      1      0      1      0      5       0      5
402A  0      1      0      1      0      50      0      50
403A  0      1      0      1      -0.00967146  0.475449  -
0.00967146  0.475449
404A  0      1      0      1      0      10      0      10
405A  0      1      0      1      0      1       0      1
406A  0      1      0      1      0      0.05   0      0.05
407A  0      1      0      1      0      100    0      100
other 0      1      0      1      0      1       0      1
*** Test Protocol Parameters ***
A/D Sampling Rate: 2000 Hz
Comment: Isometric Force Protocol
Minimum Length: -5.000 (Lo)
Maximum Length: 5.000 (Lo)
PD Deadband: 0.000000 mN
Stimulus 01: 0.3 ms 100.000 Hz 10.0 ms 50.000 Hz 0.100 s
Stimulus 02: 1.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 03: 1.3 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 04: 1.4 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 05: 1.5 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 06: 1.6 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 07: 1.7 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 08: 1.8 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 09: 1.9 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Stimulus 10: 2.2 ms 100.000 Hz 20.0 ms 2.000 Hz 100.000 s
Time (ms) Control Function Options
0.0 Data-Enable
1000.0 Length-Step 0.8 Lo
1005.0 Length-Step 1 Lo
11002.0 Length-Step 0.8 Lo
21002.0 Length-Step 1 Lo
31002.0 Data-Disable
0.0 Stop
*** Force and Length Signals vs Time ***
Time (ms) Lin (mm) Lout (mm) Fin (mN) Fout (mN) SL (um)
Stimulus/Triggers
0.0 0.09073 0.09100 0.06257 5.23069 0.00000 0
0.5 0.09123 0.09100 0.06254 5.23069 0.00000 0
1.0 0.09155 0.09100 0.06262 5.23069 0.00000 0

```

1.5	0.09149	0.09100	0.06262	5.23069	0.00000	0
2.0	0.09082	0.09100	0.06259	5.23069	0.00000	0
2.5	0.09051	0.09100	0.06262	5.23069	0.00000	0
3.0	0.09046	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
3.5	0.09091	0.09100	0.06259	5.23069	0.00000	0
4.0	0.09156	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
4.5	0.09142	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
5.0	0.09119	0.09100	0.06265	5.23069	0.00000	0
5.5	0.09062	0.09100	0.06265	5.23069	0.00000	0
6.0	0.09033	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
6.5	0.09067	0.09100	0.06283	5.23069	0.00000	0
7.0	0.09131	0.09100	0.06283	5.23069	0.00000	0
7.5	0.09158	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
8.0	0.09139	0.09100	0.06280	5.23069	0.00000	0
8.5	0.09084	0.09100	0.06265	5.23069	0.00000	0
9.0	0.09046	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
9.5	0.09046	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
10.0	0.09103	0.09100	0.06262	5.23069	0.00000	0
10.5	0.09151	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
11.0	0.09155	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
11.5	0.09112	0.09100	0.06262	5.23069	0.00000	0
12.0	0.09054	0.09100	0.06257	5.23069	0.00000	0
12.5	0.09039	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
13.0	0.09080	0.09100	0.06259	5.23069	0.00000	0
13.5	0.09125	0.09100	0.06254	5.23069	0.00000	0
14.0	0.09161	0.09100	0.06271	5.23069	0.00000	0
14.5	0.09132	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
15.0	0.09083	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
15.5	0.09037	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
16.0	0.09056	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
16.5	0.09103	0.09100	0.06271	5.23069	0.00000	0
17.0	0.09162	0.09100	0.06277	5.23069	0.00000	0
17.5	0.09152	0.09100	0.06265	5.23069	0.00000	0
18.0	0.09105	0.09100	0.06257	5.23069	0.00000	0
18.5	0.09050	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
19.0	0.09036	0.09100	0.06268	5.23069	0.00000	0
19.5	0.09087	0.09100	0.06257	5.23069	0.00000	0
20.0	0.09134	0.09100	0.06259	5.23069	0.00000	0
20.5	0.09155	0.09100	0.06277	5.23069	0.00000	0
21.0	0.09127	0.09100	0.06259	5.23069	0.00000	0
21.5	0.09077	0.09100	0.06265	5.23069	0.00000	0
22.0	0.09035	0.09100	0.06277	5.23069	0.00000	0
22.5	0.09059	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
23.0	0.09121	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0
23.5	0.09149	0.09100	0.06277	5.23069	0.00000	0
24.0	0.09153	0.09100	0.06271	5.23069	0.00000	0
24.5	0.09092	0.09100	0.06283	5.23069	0.00000	0
25.0	0.09057	0.09100	0.06277	5.23069	0.00000	0
25.5	0.09041	0.09100	0.06274	5.23069	0.00000	0

(...)