



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**Arnaldo Fim Neto**

Atividade espontânea e estimulação elétrica do  
inseto (*T. molitor*)

Botucatu – SP

2010

**Arnaldo Fim Neto**

**Atividade espontânea e estimulação elétrica do  
inseto (*T. molitor*)**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica

Orientador:

José Wilson Magalhães Bassani

Botucatu – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Fim Neto, Arnaldo.

Atividade espontânea e estimulação do inseto (*T. molitor*)  
/ Arnaldo Fim Neto. – Botucatu, 2008.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Física  
médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu.

Orientador: José Wilson Magalhães Bassani

1. Estimulação elétrica. 2. Inseto. 3. Marcapasso.

Palavras-chave: Atividade marcapasso; Bioeletricidade;  
Coração tubular; Estimulação elétrica; *T. molitor*.

## **AGRADECIMENTOS**

À meus pais Rita e Ademir, exemplos de dedicação e honestidade. Obrigado pelo apoio, pela ajuda e pelo amor incondicional.

À minhas irmãs Camila e Fabíola, a minha avó Diva e toda minha família por todo amor e apoio.

À minha namorada Gabriela por sempre estar comigo e me incentivar.

Aos meus amigos de sempre e para sempre: Hélio, Piero e Reginaldo.

Aos companheiros de República: Anderson (Âmpere); Fabiano (Demorô) e Lécio (Tio Xico). Obrigado pelo companheirismo e pelas brincadeiras ao longo desses anos.

Aos amigos de Física Médica e de Unesp, especialmente: Bianca (Joplin); Cristina (Tostines); Daniel (Fudêncio); Karen (Intubada); Mariana (Pistolão) e Mariana (Téxoro).

Ao Prof. José Wilson Magalhães Bassani. Obrigado pelos “puxões de orelha”, pelo aprendizado, pelo incentivo e por me instruir tão eficientemente.

A todos os funcionários do Ceb – UNICAMP, em especial à secretária Adriana Chaves Cavalcanti de Andrade, à bibliotecária Val Petinari, à professora Rosana Almada Bassani, ao engenheiro Sérgio Paulo Moura e aos técnicos Eugênio Carlos Carrara e Mauro Sérgio Martinazzo, e à bióloga Elizângela Souto de Oliveira.

## **RESUMO**

O coração do inseto é essencialmente miogênico, ou seja, atividade elétrica e contrações espontâneas são geradas pelas suas células musculares. Entretanto, a natureza da atividade marcapasso não está ainda totalmente elucidada. Um dos aspectos que merece atenção, além da atividade marcapasso, é a amplitude das contrações do coração do inseto. Para isso, torna-se necessário que o coração seja estimulado eletricamente para que a frequência seja controlada. No presente trabalho foi desenvolvido um método de estimulação (preparação e instrumentação). A atividade contrátil do coração do inseto se manteve regular quando estimulado a frequências ligeiramente superiores à frequência espontânea. Para caracterizar a excitabilidade da preparação a curva intensidade-duração foi determinada.

Palavras- chave: Bioeletricidade; *T.molitor*; Atividade marcapasso; Estimulação elétrica; Coração tubular.

## ***ABSTRACT***

The heart of the insect is essentially myogenic, in others words, electrical activity and spontaneous contractions are generated by their muscle cells. However, the nature of pacemaker activity is not yet fully elucidated. One aspect that deserves attention, beyond the pacemaker activity, is the amplitude of heart contractions of the insect. For this, it is necessary that the heart to be stimulated electrically to the frequency to be controlled. In the present work, it was developed a method of stimulation (preparation and instrumentation). The contractile activity of the heart of the insect remained regular when stimulated at frequencies lightly above the spontaneous frequency. To characterize excitability of the preparation the intensity-duration curve was determined.

Keywords: Bioelectricity; *T.molitor*; Pacemaker activity; electrical stimulation; Tubular heart

## Índice

### Lista de Figuras

### Lista de Tabelas

<b>1-Introdução</b>	p. 13
<b>1.1-Origem dos Biopotenciais Cardíacos</b> . . . . .	p. 13
<b>1.2-Estimulação elétrica de tecidos excitáveis</b> . . . . .	p. 15
<b>1.3-Acoplamento excitação-contração</b> . . . . .	p.17
<b>2-Objetivos específicos</b>	p. 19
<b>3-Materiais e Métodos</b>	p. 20
<b>3.1- Animais</b> . . . . .	p. 20
3.1.1-Solução fisiológica . . . . .	p. 20
3.1.2-Preparação biológica . . . . .	p. 20
<b>3.2-Dispositivos e Equipamentos.</b> . . . . .	p. 20
3.2.1-Câmara de Estimulação . . . . .	p. 20
3.2.2-Estimulador elétrico monopolar. . . . .	p. 21
<b>3.3-Procedimentos experimentais.</b> . . . . .	p. 22
3.3.1-Frequência cardíaca espontânea em resposta ao fri . . . . .	p. 22
3.3.2- Atividade espontânea na presença de diferentes concentrações externas de $Ca^{2+}$ . . . . .	p. 23
3.3.3-Curva intensidade-duração de estímulo . . . . .	p. 23
<b>3.4 Processamento estatístico dos dados.</b> . . . . .	p. 23
<b>4-Resultados</b>	p. 24
<b>4.1-Comparação da frequência cardíaca espontânea em resposta ao frio.</b> . . . . .	p. 24

<b>4.2- Frequência cardíaca na presença de diferentes concentrações externas de <math>Ca^{2+}</math></b> .....	p. 25
<b>4.3-Curva intensidade-duração de estímulo.</b> .....	p. 25
<b>5-Discussão</b>	p. 28
<b>5.1- Comparação da frequência cardíaca espontânea em resposta ao frio.</b> .....	p.28
<b>5.2- Frequência cardíaca na presença de diferentes concentrações externas de <math>Ca^{2+}</math></b> .....	p. 28
<b>5.3-Curva intensidade-duração de estímulo.</b> .....	p. 29
<b>6-Conclusão</b>	p. 30
<b>7-Referências Bibliográficas</b>	p. 31

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1- Variações da condutância para o sódio e para o potássio durante um potencial de. Modificado de Kandel (2000).

Figura 1.2 – (A) O potencial de ação de uma célula contrátil cardíaca. Os números 4,0,1,2 e 3 indicam as fases do potencial de ação e como a permeabilidade da membrana muda temporalmente aos íons.(B) Potencial de ação produzido por uma célula marcapasso. Nota-se a ausência de uma fase de platô nessas células. Modificado de Silvethorn (2008).

Figura 1.3-Diagrama de blocos para montagem de um estimulador elétrico com frequência e largura de pulso variáveis, com posterior ganho de potência (A). Exemplo de um trem de pulsos e pulso monopolar sugerindo possibilidade de variação de duração (B).

Figura 1.4 - A curva intensidade-duração. A assíntota horizontal é a reobase. O tempo mínimo para dobrar a reobase é a cronaxia. Modificado de Malmivuo & Plonsey (1995).

Figura 1.5 - Esquema geral do ciclo do íon  $Ca^{2+}$  no miócito cardíaco e principais mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contração e relaxamento cardíaco. A Figura mostra: retículo sarcoplasmático (RS); mitocôndria (Mito); troca sódio/cálcio (Na-CaX); ATPase de cálcio (ATP); miofilamentos (MF). Modificado de Bers (2001).

Figura 3.1– Circuito desenvolvido no CEB-UNICAMP. (A) chave liga-desliga; (B) alimentação com bateria; (C) componente gerador de um trem de pulsos; (D) componente controlador da largura de pulso; (E) ganho de corrente com Mosfet IRF510; (F) saída BNC do sinal.

Figura 3.3 – *Setup* montado especialmente para estudos da frequência cardíaca do coleóptero *T. molitor*. Estão indicados (A) estimulador monopolar, (B) lupa, (C) sistema de

perfusão, (D) câmara de estimulação, (E) sistema de vácuo para circular solução fisiológica e (F) par de eletrodos de aço inox.

Figura 4.2 – Relação  $[Ca^{2+}]_o$  – frequência no coração do inseto. A linha indica a curva aproximada por regressão não-linear.

Figura 4.3 – O gráfico mostra o comportamento da intensidade limiar em função da largura de pulso. A linha contínua um fitting monoexponencial decrescente. A assíndota horizontal é a reobase média de 5,76 V. Cronaxia é tempo para dobrar a reobase, que foi um valor de 0,83 ms.

## ***LISTA DE TABELAS***

Tabela 4.1 –Comparação entre Bpm do T. molitor colocado isoladamente à baixa temperatura (4°C) e temperatura ambiente (Controle) de 23°C. A média e o erro são especificados.

Tabela 4.3 – Tensão limiar calculada para cada largura de pulso. Cada experimento está indicado nas colunas abaixo da tensão limiar.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$[Ca^{2+}]_i$  – Concentração no meio intracelular de íons  $Ca^{2+}$

$[Ca^{2+}]_0$  – Concentração externa de íons  $Ca^{2+}$ .

CEB – Centro de Engenharia Biomédica

LPCv – Laboratório de Pesquisa Cardiovascular

MF – Miofilamentos

MITO – Mitocôndria

NAV – Nodo átrioventricular

NSA – Nodo sinoatrial

PA – Potencial de ação

RS – Retículo Sarcoplasmático

RyR – Receptores de rianodina

$V_m$  – Potencial de membrana

TnC – Troponina-Cálcio

TS – Solução fisiológica

# 1-Introdução

## 1.1-Origem dos Biopotenciais Cardíacos

Nesse tópico será descrito o comportamento das células excitáveis, especialmente do tecido muscular cardíaco. As células excitáveis são envolvidas por uma membrana (espessura 10 nm) com múltiplas funções, incluindo controlar a passagem de substâncias (íons e moléculas) para dentro e fora da célula. As propriedades elétricas das células dependem do comportamento da membrana aos íons (Plonsey & Barr 1988).

A *permeabilidade seletiva* da membrana a alguns íons, pelos seus *canais iônicos*, e a assimetria da composição iônica (mantida por transporte ativo de íons) entre os meios extra e intracelular contribuem para geração de uma diferença de potencial transmembrana (negativo dentro, com relação ao meio externo), o potencial *de repouso*. Importante é entender como o potencial de membrana varia, produzindo o chamado *potencial de ação* (PA) na fibra eletricamente excitável, e como o PA se propaga (Plonsey & Barr 1988).

Em repouso, o potencial de membrana  $V_m$  varia entre -60 e -90 mV (Garcia, 1998). Se a célula for estimulada, o  $V_m$  torna-se menos negativo, e com isso, a membrana é *despolarizada*. Quando a despolarização alcança um determinado valor de potencial, um limiar de potencial, ocorre o disparo do PA. O PA é disparado quando a impedância da membrana cai devido à abertura significativa de um grande número de canais de  $\text{Na}^+$  *voltagem-dependentes*, que leva  $V_m$  para valores menos negativos (Aidley, 1998), e em seguida retorna ao valor negativo de repouso. Esse último estágio é denominado *repolarização* da membrana.

A partir do momento em que é disparado, o PA não é mais controlado pelo estímulo externo e se propaga por toda a célula, por meio do acoplamento espacial da corrente elétrica (Aidley, 1998). A constância da amplitude e forma do potencial de ação para qualquer estímulo de intensidade supralimiar é conhecido como *lei do tudo ou nada*. O aumento da intensidade de um estímulo elétrico sobre o coração resulta no aumento da frequência de potenciais de ação propagados, logo a amplitude de potencial de ação não aumenta com o aumento da intensidade de estímulo. A frequência máxima é limitada pela duração do período refratário absoluto (detalhado a seguir), que é de cerca de 1 ms nas células nervosas.

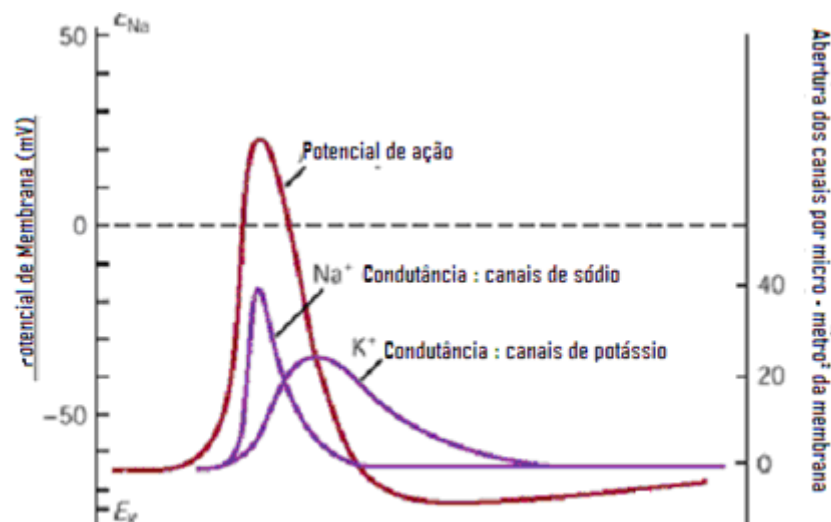


Figura 1.1- Variações da condutância para o sódio e para o potássio durante um potencial de. Modificado de Kandel (2000).

Quando o intervalo entre dois pulsos sucessivos é reduzido, o limiar de excitabilidade para a geração do segundo potencial de ação aumenta progressivamente até que, para intervalos muito curtos, é impossível gerar um segundo potencial de ação, independentemente da intensidade de estimulação. Este período é denominado *período refratário* e se divide em um *período refratário absoluto*, no qual a membrana é inexcitável, e um *período refratário relativo*, durante o qual a membrana recupera gradativamente sua excitabilidade. Durante o período refratário absoluto, fração maior dos canais de  $\text{Na}^+$  está inativada e não podem ser abertos até que a membrana esteja repolarizada. Já, no período refratário relativo, antes que o potencial de membrana tenha retornado a seu valor de repouso, parte menor dos canais de  $\text{Na}^+$  ainda permanece inativada. Por conseguinte, é necessário estímulo mais intenso que o normal para abrir o número crítico de canais de  $\text{Na}^+$  para gerar o potencial de ação. Por todo o período refratário relativo, a condutância ao  $\text{K}^+$  fica aumentada, o que se opõe à despolarização da membrana.

O PA de uma célula cardíaca é diferente do PA nervoso principalmente por possuir uma fase de platô (Figura 1.2). Suas fases são: (fase 4) potencial de repouso da membrana (no miocárdio,  $-90 \text{ mV}$ ); (fase 0) despolarização, entrada de íons  $\text{Na}^+$  na célula e  $V_m$  atinge  $+20 \text{ mV}$ ; (fase 1) repolarização inicial; (fase 2) fase de platô, diminuição da permeabilidade aos íons  $\text{K}^+$  e aumento da permeabilidade aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  com uma repolarização lenta; (fase 3) repolarização rápida, aumento da permeabilidade aos íons  $\text{K}^+$ , retornando ao potencial de repouso da membrana.

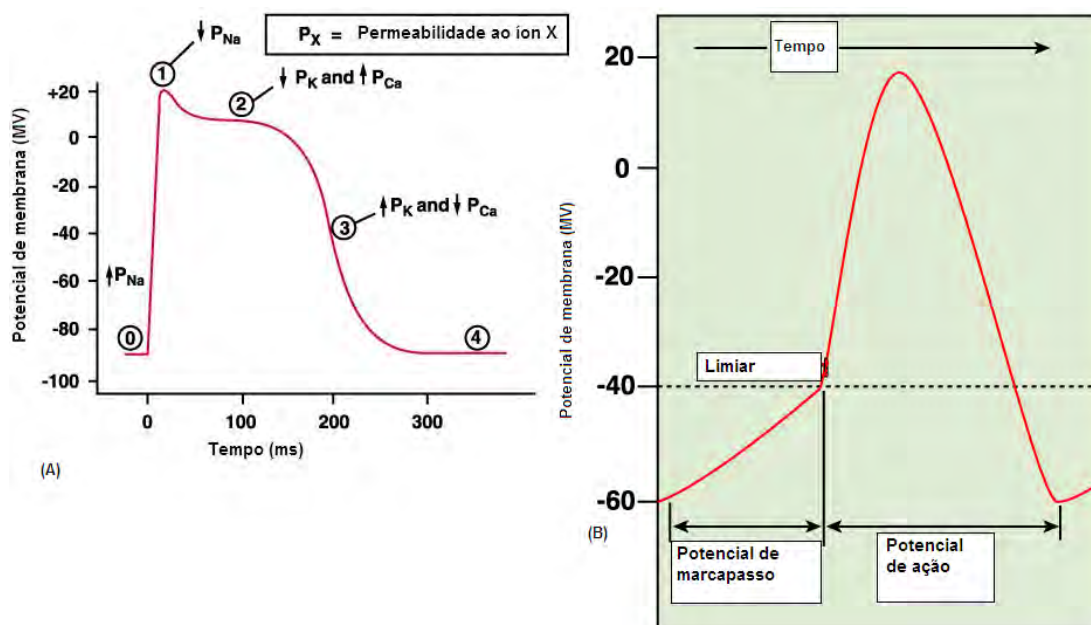


Figura 1.2 – (A) O potencial de ação de uma célula contrátil cardíaca. Os números 4,0,1,2 e 3 indicam as fases do potencial de ação e como a permeabilidade da membrana muda temporalmente aos íons.(B) Potencial de ação produzido por uma célula marcapasso. Nota-se a ausência de uma fase de platô nessas células. Modificado de Silvethorn (2008).

A ativação elétrica dispara o processo contrátil cardíaco de modo que o sangue possa ser ejetado adequadamente para circulação. No átrio direito, está localizado o nódulo sinoatrial (NSA), que é o marcapasso primário. As células marcapasso são auto-excitáveis e possuem habilidade para gerar espontaneamente PAs. A despolarização se inicia no NSA e se propaga para células atriais vizinhas. A atividade elétrica encontra rapidamente o nódulo atrioventricular (NAV), situado próximo à base do átrio direito. A partir do NAV saem fibras especializadas na condução elétrica que formam o feixe de His-Purkinje, que segue para ao ápice do coração. A onda de despolarização, por fim, atinge as fibras de Purkinje, que penetram nas paredes ventriculares, dirigindo-se ao epicárdio e à base ventricular (Silverthorn, 2008).

### 1.2-Estimulação elétrica de tecidos excitáveis

As células cardíacas, quando em solução nutriente e condutora de eletricidade, podem ser ativadas utilizando campo elétrico externo. O campo elétrico externo varia o potencial ao redor da

célula com a finalidade de disparar um PA em uma região e posteriormente se propagar para toda a região da fibra muscular, iniciando o processo contrátil.

Um estímulo elétrico pode ser aplicado com auxílio de um par de eletrodos conectados a um estimulador. Um bom estimulador deve produzir pulsos retangulares, com amplitude (Voltagem), largura de pulso (Duração em ms) e freqüência (Hz) variáveis (Aidley, 1998).

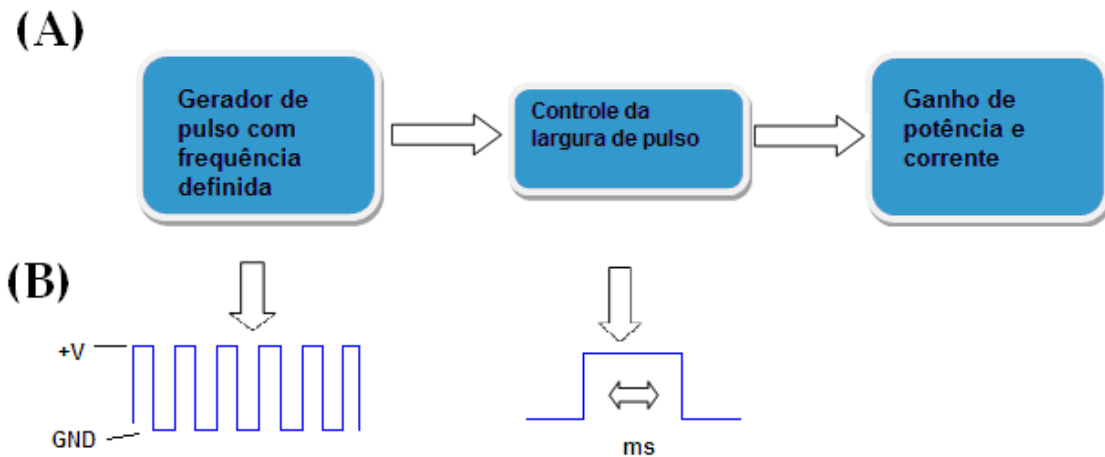


Figura 1.3 - Diagrama de blocos para montagem de um estimulador elétrico com freqüência e largura de pulso variáveis, com posterior ganho de potência (A). Exemplo de um trem de pulsos e pulso monopolar sugerindo possibilidade de variação de duração (B).

Quando um músculo é estimulado com um pulso retangular, a intensidade limiar aumenta quando a duração do pulso diminui. A curva que descreve o limiar para diferentes durações e intensidades é conhecida curva intensidade-duração (Figura 1.4). A assíndota horizontal é denominada *reobase*, e o tempo para intensidade igual ao dobro da reobase é a *cronaxia*.

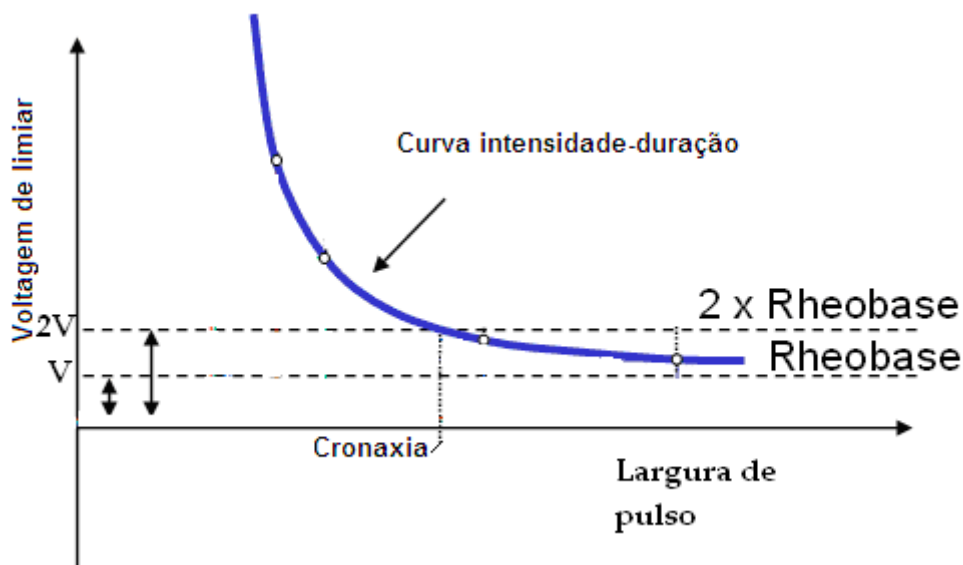


Figura 1.4 - A curva intensidade-duração. A assíntota horizontal é a reobase. O tempo mínimo para dobrar a reobase é a cronaxia. Modificado de Malmivuo & Plonsey (1995).

### 1.3-Acoplamento excitação-contração

Durante o PA cardíaco, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  pode entrar na célula via canais de cálcio voltagem-dependentes presentes no sarcolema e também via troca  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . O íon  $\text{Ca}^{2+}$  pode contribuir diretamente para a ativação dos miofilamentos (MF), e também interage com os sítios de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  nos canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS), os chamados receptores de rianodina (RyR), provocando a liberação de grande quantidade do íon. Quando a concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) se eleva, a ligação do íon aos MF gera o processo de encurtamento e produção de força. Para que o relaxamento ocorra,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  deve ser removido do citoplasma e desligado do TnC dos MF. Grande parte desse íon é recaptado pelo retículo sarcoplasmático através da ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA2) e parte significativa é transportada para fora da célula via troca de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Bers et. al., 1991). Todo esse processo é detalhado na Figura 1.5.

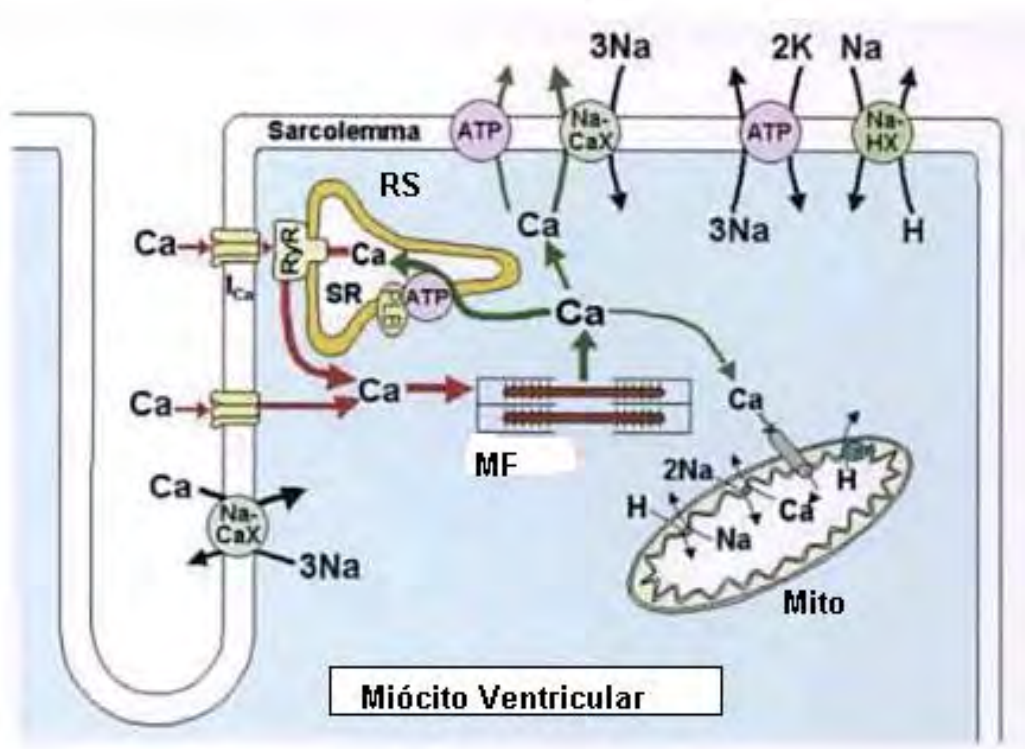


Figura 1.5 - Esquema geral do ciclo do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito cardíaco e principais mecanismos envolvidos no acoplamento excitação-contracção e relaxamento cardíaco. A Figura mostra: retículo sarcoplasmático (RS); mitocôndria (Mito); troca sódio/cálcio (Na-CaX); ATPase de cálcio (ATP); miofilamentos (MF). Modificado de Bers (2001)

A participação relativa dos transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  no coração de mamíferos já foi descrita quantitativamente (Bassani et al., 1994).

A circulação da hemolinfa nos insetos é mantida por uma bomba muscular, denominada vaso dorsal, em forma tubular e localizada dorsalmente. Suas partes são divididas em coração, localizado no abdômen, e aorta, que se estende até o tórax. O coração coleta hemolinfa da cavidade abdominal que desemboca na cabeça através da aorta (Chapman, 1975). As paredes do coração e da aorta são contráteis e são compostas por uma única camada de músculos estriados, arranjados uma rede intercalada de fibras longitudinais e radiais (McCann, 1963; Miller, 1985).

O coração de um inseto é essencialmente miogênico, contrações espontâneas são geradas pelas células musculares cardíacas, mas o batimento pode ser influenciado pelo sistema nervoso ou neurohormônios. Entretanto, a natureza da atividade de marcapasso e elétrica não está ainda totalmente elucidada. O SR está presente em suas células, mas não é bem desenvolvido, e os túbulos-T são irregularmente espaçados (Nation, 2008).

No Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv) – Centro de Engenharia Biomédica (CEB)-UNICAMP está em andamento um projeto que tem por objetivo estudar o papel do RS na atividade espontânea do coração do inseto *T. molitor*, da lagartixa (*H. mabouia*) e de ratos (*R. norvegicus*) neonatos. Um dos aspectos que se pretende investigar, além da atividade marcapasso, é a amplitude das contrações do coração do inseto. Para isso torna-se necessário que o coração seja estimulado eletricamente para que a frequência seja controlada. No presente estágio de final de curso, foi planejado o contato com a preparação biológica, o apoio ao desenvolvimento de instrumentação e a iniciação ao trabalho de experimentação.

## **2-Objetivos específicos**

1. Estudar a frequência cardíaca espontânea da preparação submetida a diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no líquido de perfusão;
2. Estudar a frequência cardíaca espontânea do animal submetido ao frio;
3. Desenvolver método para estimular eletricamente o coração tubular do coleóptero *T. molitor* para estudos fisiológicos;
4. Determinar a curva intensidade – duração da preparação;

## **3-Materiais e Métodos**

### **3.1- Animais**

Os animais (*T. molitor*) (proveniente de criação do LPCv do CEB – UNICAMP) foram mantidos em caixas plásticas com aeração (temperatura 25° C, umidade relativa de aproximadamente 65). Insetos adultos, de ambos os sexos, foram criados em colônias no LPCv Ceb – UNICAMP, e alimentados com frutas, batatas, milho e farelo de aveia. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura de 25°C, foto-período de 12:12h e não foram manipulados ou submetidos a nenhuma condição de “stress”. Besouros adultos de 10 - 15 dias de idade foram utilizados para os experimentos.

#### *3.1.1-Solução fisiológica*

A solução fisiológica para *T. molitor* (TS) foi preparada em água deionizada, com a seguinte composição em milimolar (mM) : 274 NaCl; 19 KCl; 5 Hepes; 5 glucose; pH=7,0. CaCl<sub>2</sub> era adicionado em concentrações diferentes conforme o experimento.

#### *3.1.2-Preparação biológica*

Depois da anestesia, o animal foi decapitado, suas pernas e asas removidas. Foi feita uma incisão em uma linha no centro do abdômen e tórax. Intestino, músculos abdominais e glândulas retiradas para expor a região dorsal. Os resultados são o coração, alguns músculos e uma cutícula dorsal. A largura do coração de um adulto varia entre 0,08-0,13 mm, e seu comprimento gira em torno de 4,25 mm (Theophilidis et. al., 2000). A preparação foi perfundida com TS durante 15 min para estabilização da atividade espontânea e avaliação da frequência cardíaca por inspeção visual usando lupa estereoscópica.

### **3.2-Dispositivos e Equipamentos**

#### *3.2.1-Câmara de Estimulação*

A câmara de estimulação é feita com uma placa de Petri, sobreposta a uma base sólida de alumínio para evitar abruptos movimentos na preparação. Nessa placa, foi adicionado um polímero flexível no qual se poderia fixar o animal, com agulhas de acupuntura de aço inox. A

estratégia de se colocar um polímero flexível também se origina da idéia de perfurar transversalmente ao coração dois eletrodos de aço inoxidável.

Com inserção de luz acima da preparação, foi possível visualizar o tecido exposto com auxílio uma lupa (D.F.V. Vasconcelos S.A., São Paulo) e assim, manipulá-lo adequadamente com materiais cirúrgicos.

### 3.2.2-Estimulador elétrico monopolar

Para o desenvolvimento de um estimulador elétrico monopolar, primeiramente foi feito um modelo do circuito elétrico no software Proteus versão 7.6. O circuito, com componentes elétricos adequados foi testado com auxílio de um Protoboard, e um trem de pulso com amplitude (voltagem), largura (tempo) e freqüência (Hz) de estímulo foi visualizado no osciloscópio.

Os componentes foram adicionados a uma placa de cobre. O circuito foi novamente testado no osciloscópio, posteriormente, posto em uma caixa. Seu sinal é conectado a um par de eletrodos.



Figura 3.1– Circuito desenvolvido no CEB-UNICAMP. (A) chave liga-desliga; (B) alimentação com bateria; (C) componente gerador de um trem de pulsos; (D) componente controlador da largura de pulso; (E) ganho de corrente com Mosfet IRF510; (F) saída BNC do sinal.

### 3.3-Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos a seguir foram feitos no *setup* da figura 3.3, e mantidos à uma temperatura de 23 ° C.



Figura 3.3 – *Setup* montado especialmente para estudos da frequência cardíaca do coleóptero *T. molitor*. Estão indicados (A) estimulador monopolar, (B) lupa, (C) sistema de perfusão, (D) câmara de estimulação, (E) sistema de vácuo para circular solução fisiológica e (F) par de eletrodos de aço inox.

#### 3.3.1-Frequência cardíaca espontânea em resposta ao frio.

Dois insetos foram isolados do restante do grupo, e colocados em frascos diferentes. Um foi posto na geladeira à baixa temperatura (4°C) e o outro à temperatura de 23°C. Ambos foram isolados por 1 hora. O *T. molitor* foi anestesiado e a cirurgia foi feita nos 15 minutos seguintes. Após 30 minutos para estabilização, foi registrado o número de batimentos por minuto por inspeção visual via lupa estereoscópica e com auxílio de um cronômetro. Terminado o experimento, o outro *T. molitor* isolado também se submetia ao mesmo procedimento. Repetiu-se o procedimento para outros 10 animais.

### *3.3.2- Atividade espontânea na presença de diferentes concentrações externas de $Ca^{2+}$ .*

Em uma população de seis insetos, foi estudada a resposta cronotrópica a diferentes concentrações de  $Ca^{2+}$  (0, 1, 2, 4, 8 e 16 mM). Iniciou-se com a menor concentração, aumentando progressivamente. Após a troca da solução de perfusão um período de 5 minutos foi necessário para estabilização da frequência. O número de batimentos cardíacos por minuto foi registrado por inspeção visual.

### *3.3.3-Curva intensidade-duração de estímulo*

Para esse procedimento, foram ajustados dois pares de eletrodos transversos ao coração do animal. A estimulação elétrica de corações de uma população de cinco insetos foi feita com um estimulador comercial (GRASS-Instruments), usando pulsos retangulares de tensão. na frequência de 1,5 Hz diferentes larguras de pulsos (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2, 4, 8, 16, 32, e 64 ms). No início, ajustou-se a maior largura de pulso possível. Aumentou-se gradativamente a voltagem até o momento em que a frequência de batimento cardíaco acompanhasse a frequência de estímulo. Anotou-se a voltagem limiar para aquela largura de pulso. O experimento era repetido no mesmo inseto para as outras larguras de pulso.

### *3.4 Processamento estatístico dos dados*

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (amostras não pareadas que não seguem necessariamente, distribuição normal) foi utilizado para comparações entre médias.

## 4-Resultados

### 4.1-Comparação da frequência cardíaca espontânea em resposta ao frio

Animais submetidos à baixa temperatura (4°C durante 1 hora) apresentaram frequência espontânea significativamente maior ( $76 \pm 3,78$  bpm) que os animais controle ( $56,7 \pm 5,95$  bpm) ( $P < 0.05$ ,  $N = 6$ ) (Tabela 1).

Tabela 4.1 – Comparação entre Bpm do T. molitor colocado isoladamente à baixa temperatura (4°C) e temperatura ambiente (Controle) de 23°C. A média e o erro são especificados.

Experimento	Geladeira	Controle
1	71	89
2	70	44
3	84	48
4	70	59
5	68	55
6	93	63
<b>Média</b>	76	56,7
<b>EPM</b>	3,78	5,95

#### 4.2- Frequência cardíaca na presença de diferentes concentrações externas de $\text{Ca}^{2+}$

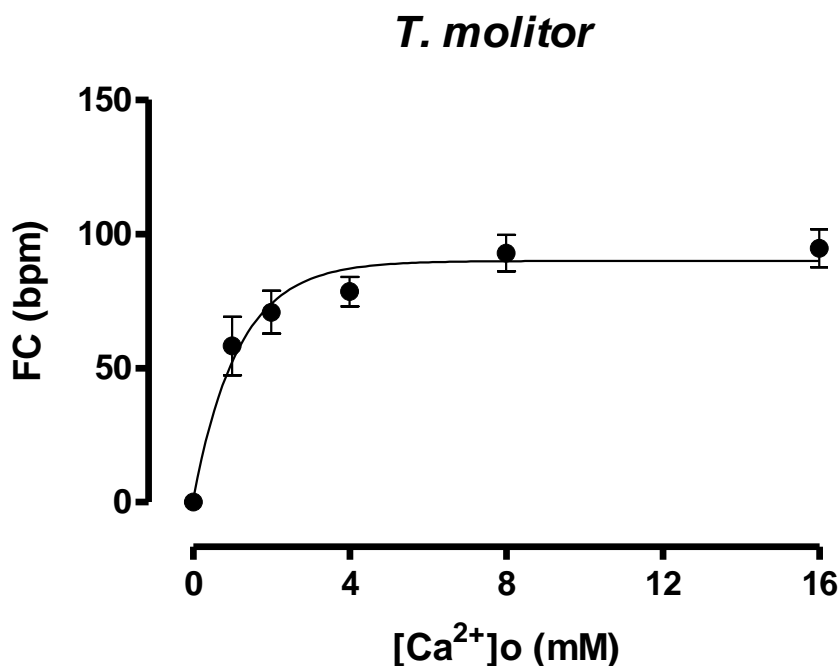


Figura 4.2 – Relação  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  – frequência no coração do inseto. A linha indica a curva aproximada por regressão não-linear.

O íon cálcio está intimamente ligado ao processo contrátil e pela relação força-frequência. A Figura 4.2 mostra a relação exponencial crescente entre o número de batimentos por minuto e a concentração de cálcio em mM. No intervalo de 0-1 mM se torna mais acentuado o crescimento da curva. No intervalo de 8-16 mM, a frequência de contração cardíaca já não aumenta com a variação de concentração de cálcio (saturação). A amplitude das contrações ainda não foram visualizadas e analisadas. Um dispositivo para realizar estas medições vem sendo desenvolvido e fará parte de estudos futuros.

#### 4.3-Curva intensidade-duração de estímulo

Como o coração apresenta atividade espontânea, para realizar a estimulação foi necessário aplicar frequências ligeiramente superiores à frequência espontânea. Desta forma observou-se quando o tecido cardíaco acompanhava a frequência estimulatória. Procurou-se eliminar a

influencia do sistema nervoso, mas as terminações nervosas não foram tratadas ou destruídas. A Tabela 4.3 ilustra a curva intensidade-duração que pode ser visualizada na Figura 4.3.

Tabela 4.3 – Tensão limiar calculada para cada largura de pulso. Cada experimento está indicado nas colunas abaixo da tensão limiar.

<b>ms</b>	<b>Tensão limiar (Volts)</b>					<b>Média</b>	<b>Erro (+-)</b>
<b>0,10</b>	36,00		40,00	41,00		39,00	1,53
<b>0,20</b>	34,00		18,00	27,00		26,33	4,63
<b>0,40</b>	21,00	20,00	13,00	19,00		18,25	1,80
<b>0,80</b>	15,00	12,00	5,50	12,90		11,35	2,05
<b>1,00</b>	14,00	11,00	4,50	11,00	13,00	10,70	1,66
<b>2,00</b>	10,60	9,70	4,20	8,60	12,40	9,10	1,38
<b>4,00</b>	7,00	8,70	4,00	6,60	11,00	7,46	1,16
<b>8,00</b>	5,50	8,00	3,10	5,20	8,20	6,00	0,95
<b>16,00</b>	3,90	6,10		4,80	7,00	5,45	0,69
<b>32,00</b>	3,60	5,40		4,20	4,90	4,35	0,39
<b>64,00</b>	3,40	5,00		3,80	4,40	4,15	0,35
<b>Reobase (V)</b>	5,25	6,95	4,68	5,80	4,52	5,44	0,44
<b>Cronaxia (ms)</b>	1,9	0,70	0,50	0,90	7,00	2,20	1,23

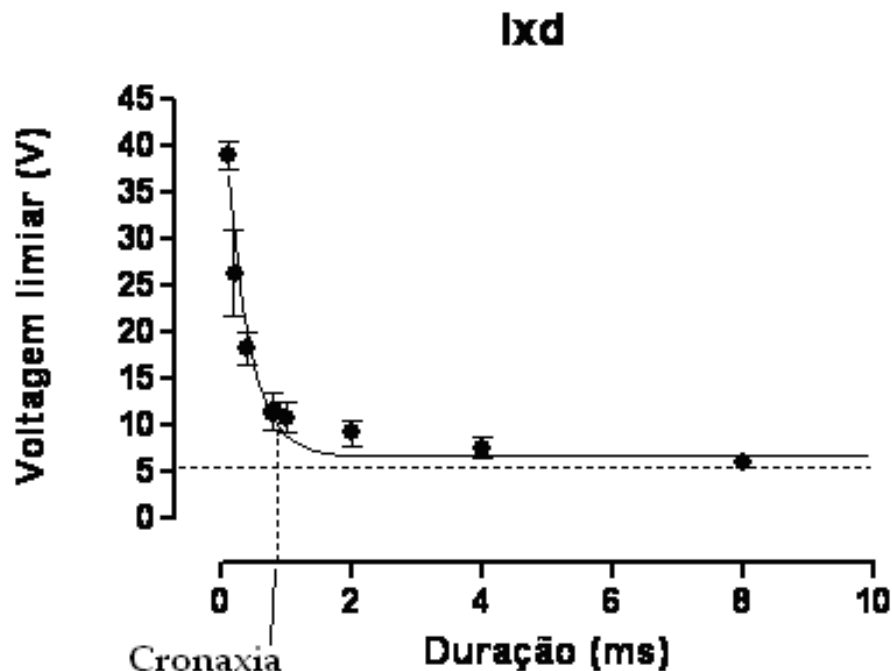


Figura 4.3 – O gráfico mostra o comportamento da intensidade limiar em função da largura de pulso. A linha contínua um fitting monoexponencial decrescente. A assíntota horizontal é a reobase média de 5,76 V. Cronaxia é tempo para dobrar a reobase, que foi um valor de 0,83 ms.

Foi feito um *fitting* de uma função mono e bi-exponencial. Os dados apresentados pela figura 4.2 foram aproximados por uma curva mono-exponencial, embora o coeficiente R que fornece a qualidade da curva ( $0 < R < 1$ ) fosse melhor para bi-exponencial ( $R=0,9089$ ) do que a mono-exponencial ( $R=0,8789$ ).

Observa-se uma nítida aproximação entre as curvas experimental e a ajustada com uma função exponencial. A *reobase* é a assíntota horizontal e a *cronaxia* é o tempo para dobrar a *reobase*, em que se obteve um valor médio de 0,83 ms.

## 5-Discussão

### 5.1- Comparação da frequência cardíaca espontânea em resposta ao frio

O aumento da frequência cardíaca em virtude a um transtorno causado a um indivíduo é uma maneira simples e eficaz de se comprovar o stress. Entretanto, ainda não é bem claro se a frequência cardíaca nos insetos pode variar em um momento de reação a um fator externo. Por isso, foi feita a escolha de que um animal ficaria por uma hora isolado à baixa temperatura (4°C) e o outro à temperatura de 23°C, de modo que pudesse se verificar alguma alteração na frequência de contrações espontâneas do coração.

O inseto *T. molitor* possui uma proteína anti-congelante, que pode ser ativada para proteger suas células do stress causado pela baixa temperatura. Nos besouros, o balanço osmótico pode ser alterado durante exposição ao frio e o metabolismo se altera (Riddle, 1986). Uma possível função dessas proteínas seria seqüestrar íons ou outros solutos da hemolinfa para ajudar na manutenção do equilíbrio osmótico e armazená-los para uso posterior (Walker et. Al., 1995). Não é sabido até o presente momento, se há alguma influência dos ajustes e eventual liberação endógena de substâncias sobre a atividade cronotrópica do animal. Encontramos diferenças significativas entre os grupos de animais tratados com frio por 1 hora e controle. Este resultado ainda preliminar será motivo de novas investigações no LPCv.

### 5.2- Frequência cardíaca na presença de diferentes concentrações externas de $Ca^{2+}$

A entrada de  $Ca^{2+}$  no sarcolema é feita principalmente através de canais de  $Ca^{2+}$  *voltagem-dependentes* (Tipo – L) e pequena parcela pela troca  $Na^+$  por  $Ca^{2+}$ . O RS da musculatura esquelética nos insetos é abundante (Hagopian & Spiro, 1967). Entretanto, o RS na musculatura cardíaca é escasso. Os PAs no tecido marcapasso são dependentes do influxo de íon  $Ca^{2+}$  (Theophilidis, 2000), e a frequência cardíaca foi alterada com a mudança de  $[Ca^{2+}]_o$ . Contudo, a interação funcional do RS com os túbulos-T não são plenamente esclarecidas no coração do inseto (Hagopian & Spiro, 1967). Estudos experimentais no LPCv - UNICAMP sugerem que a o controle de frequência pelo  $Ca^{2+}$  externo está intimamente relacionado com a presença de um RS funcionalmente ativo (Feliciano & Bassani, comunicação pessoal).

### **5.3-Curva intensidade-duração de estímulo**

Aparentemente não há atividade elétrica marcapasso na aorta, e a duração de seu PA é dependente da duração do PA marcapasso, situado no quarto segmento (mais caudal) do coração. Há uma perfeita coordenação das contrações dos segmentos do coração com a aorta. Este fato, juntamente com a comprovação da presença de discos intercalares no músculo cardíaco (Sanger et. al., 1969), mostra claramente que existe um acoplamento elétrico entre o coração e a aorta (Theophilidis et. al., 2000).

Não pudemos encontrar na literatura, nenhum experimento que mostre a atividade contrátil do coração tubular do inseto desencadeada por estímulo elétrico externo. No LPCv-UNICAMP foi desenvolvido um método para que a frequência cardíaca fosse controlada pela frequência de estímulo elétrico. A estimulação foi eficaz quando um par de eletrodos foi inserido tanto na aorta quanto no coração. Prevaleceu o estímulo na aorta, e houve uma coordenação contrátil entre as duas regiões.

A curva intensidade-duração é um teste para se visualizar o comportamento da voltagem limiar em função de uma largura de pulso determinada. Uma frequência de estímulo de 1,5 Hz induziu uma atividade contrátil de 90 Bpm, e esse padrão foi mantido para todos os insetos. Para captação da voltagem limiar, o experimento se iniciava com a menor largura de pulso possível. Essa estratégia tem como princípio não polarizar a preparação fisiológica com altas voltagens iniciais, devido ao trem de pulso monopolar do estimulador. Pois, quando diminuísse a largura de pulso, o tecido cardíaco não seria estimulado. Entretanto, em dois intervalos de 0,1-0,8 ms e 16-64 ms a frequência cardíaca não acompanhou a frequência de estimulação.

A experiência já acumulada no LPCv indica que não é fácil estimular preparações muito pequenas usando campo elétrico externo e que o campo de alta intensidade pode ser letal (Oliveira et al., 2008). Deste modo será muito importante continuar este trabalho para investigar os aspectos ligados a atividade contrátil do coração, tendo em vista a possibilidade, demonstrada neste trabalho, de manter constante a frequência estimulatória.

## 6-Conclusão

Para estudar a estimulação elétrica do coração do *T. molitor*, pude tomar contato com diversas áreas, desde o aprendizado da preparação biológica, até a instrumentação biomédica, especialmente o desenvolvimento de estimuladores e a experiência com sensores para transdução de sinais biológicos. Com isso, foi iniciado um trabalho de experimentação.

A metodologia empregada para fornecer as condições necessárias para estimulação elétrica do coração do inseto mostrou-se eficaz e parece ser um dado novo na literatura. Outro ponto foi a resposta da frequência cardíaca ao frio, havendo uma considerável diferença entre as populações Controle e Frio, um fato que sugere que o *T. molitor* possa ter sido “estressado” devido a baixa temperatura.

Para estudos futuros, quando um sistema que possua uma fonte de luz, uma lente ampliadora e um sensor de luz sejam adicionados ao *setup*, com a estimulação elétrica mantida em uma determinada frequência, poder-se-á analisar a relação força-frequência de contração em resposta a  $[Ca^{2+}]_0$  na solução ou por alguma droga, pois a imagem do coração será projetada em um sensor de luz e amplificada para um osciloscópio para análise das amplitudes de contrações cardíacas

O custo de manutenção dos insetos é baixo quando comparado com ratos e outros animais de laboratório. A proposta de novos modelos animais, em particular de invertebrados parece muito bem vinda para melhorar as possibilidades de testes com quantidades mais elevadas de indivíduos e como um passo inicial para outros testes futuros. Não há razões para se considerar que, sob o ponto de vista evolutivo, os insetos não escondam características fundamentais do funcionamento de sistemas que foram de sucesso na evolução e estes ou algum semelhante não estejam presentes no coração de mamíferos, incluindo o coração humano.

Esse trabalho me incentivou para estudos mais aprofundados em nível de pós-graduação e meu orientador de TCC está encaminhando a proposta de me aceitar para realização de mestrado junto ao Departamento de Engenharia Biomédica da FEEC – UNICAMP.

## 7-Referências Bibliográficas

-AIDLEY, D. J. *The Physiology of Excitable Cells*. 4. ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1998. 477 p

-BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A.; BERS, D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of Physiology*, v. 476, n. 2, p. 279-293, abr. 1994.

-BASSANI, J.W.M.; BASSANI, R.A. Contribution of  $Ca^{2+}$  transporters to relaxation in intact ventricular myocytes from developing rats. *American Journal of Physiology*, v. 282, n. 6, p.H2406-H2413, jun. 2002.

-BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B. M.; STATON, B. A. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2004. 1082 p.

- BERS, D.M. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 1. ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. 218 p.

-BRONZINO, JOSEPH. D. *The Biomedical Engineering Handbook*. 2 ed. CRC Press & IEEE Press, 2000. 1656 p..

- GARCIA, E.A.C. *Biofísica*. São Paulo, Brasil: Sarvier, 1998. 387 p.

- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

-HAGOPIAN, M.; SPIRO, D. The sarcoplasmic reticulum and its association with the T system in a insect. *The Journal of Cell Biology*, v.32, mar. 1967.

-KANDEL, ERIC R., SCHWARTZ, JAMES H., JESSEL, THOMAS M. *Principles of Neural Science*. 4 ed. 2000,. 1414 p.

- MALMIVUO, J.; PLONSEY, R. *Bioelectromagnetism – Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields*. New York: Oxford University Press, 1995. 512 p.

-MORBIDUCCI, U.; SCALISE,L.; MELIS,M. DE; GRIGIONI,M. Optical Vibrocardiography: A Novel Tool for the Optical Monitoring of Cardiac Activity. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 35,p. 45-58,jan. 2007

-OLIVEIRA PX, BASSANI RA, BASSANI JWM. Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55(11), 2008.

-SANGER, JOSEPH W. Cardiac fine structure in Selected arthropods and molluscs. *Amer. Zool*, v. 19, p. 9-27, 1979.

-PANAGOPOULOS, DIMITRIS J., KARABARBOUNIS, A., MARGARITIS, LUKAS H. Mechanism for action of eletromagnetic fields on cels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 298, p. 95-102, set.2002.

-PLONSEY,R.; BARR, ROGER C.; *Bioelectricity*.1. ed. Plenium Press,1988,305 p.

- SILVERTHORN, D.U. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada*. 3. ed. Barueri: Manole, 2008. 816 p.

-THEOPHILIDS, G.; MARKOU,T. The pacemaker activity generating the intrinsic myogenic contraction of the dorsal vessel of *Tenebrio molitor* (Coleoptera).*The Jornal of Experimental Biology* 203, p. 3471-3483, out. 2000.

-WALKER, VIRGINIA K.; GRAHAM, LAURIE A.; BENDENA, WILLIAM G.Cloning and Baculovirus Expression of Desiccation Stress Gene from the Beetle, *Tenebrio molitor* . *Insect Biochem. Molec.Biol*, v. 26, n. 2,p.127-133, ago. 1996.