

3

Metodologia

Neste capítulo é descrita a metodologia utilizada para o estudo da influência das resoluções espacial e temporal na morfologia do potencial de ação óptico. Este estudo foi realizado por meio de potenciais de ação simulados, experimentais e destes sinais simulados e experimentais processados digitalmente. A análise dos dados experimentais e dos efeitos do processamento de sinais foi realizada de forma qualitativa e quantitativa por meio do estudo da propagação da atividade elétrica, utilizando o padrão de ativação dos mapas ópticos, e do estudo do potencial de ação óptico, por meio de parâmetros relacionados com a morfologia do *upstroke*, respectivamente.

Este capítulo foi dividido em quatro partes: Mapeamento óptico da fluorescência gerada pela atividade elétrica de corações isolados de coelho; Simulação da resposta elétrica de células cardíacas; Processamento de sinais experimentais e simulados e Indicadores de distorção da morfologia do potencial de ação.

3.1

Mapeamento óptico da fluorescência gerada pela atividade elétrica de corações isolados

O uso de métodos de detecção óptica para medir o potencial transmembranar de células excitáveis foi iniciado na década de 70 [5,6], e a sensibilidade de corantes potenciométricos e de sistemas de detecção tem avançado consideravelmente. A detecção da fluorescência de corantes potenciométricos aplicados em tecidos excitáveis vem sendo utilizada não somente para a realização de estudos da propagação da frente de onda da excitação elétrica tecidual, como também na análise dos diferentes parâmetros eletrofisiológicos caracterizados pela morfologia do potencial de ação óptico.

Em 1895, Oscar Langendorff idealizou um método para estudar a atividade mecânica do coração isolado [55]. Canulando a aorta ascendente, ele foi capaz de perfundir as artérias coronárias e manter a atividade cardíaca. Desde Langendorff, esse método tem sido utilizados com sucesso para o estudo de

corações isolados de mamíferos [56]. O sistema Langerdoff permite o estudo das propriedades mecânicas do coração, do fluxo coronariano e o estudo metabólico do órgão isolado [57]. O estudo da eletrofisiologia de corações isolados pode ser feito utilizando corantes potenciométricos para mapear a atividade elétrica superficial do tecido cardíaco pela detecção da fluorescência e obtenção do potencial de ação transmembranar. Essa técnica permite a visualização da propagação da atividade elétrica no coração e a análise localizada do potencial de ação em uma pequena região do coração. Entretanto, as resoluções temporal e espacial do sistema de detecção da fluorescência podem introduzir distorções nos sinais adquiridos.

Corações isolados de coelhos são frequentemente utilizados em estudos da eletrofisiologia cardíaca por possuírem tamanho médio, facilitando intervenções cirúrgicas, e várias características moleculares, celulares e anatômicas similares aos humanos. Neste trabalho utilizaram-se corações isolados de coelho perfundidos com solução nutriente contendo corantes potenciométricos para aquisição de mapas ópticos da atividade elétrica cardíaca. Essas medições foram feitas utilizando a infraestrutura da Universidade de Vanderbilt (EUA) disponibilizada por meio de colaboração com o professor John P. Wikswo do *Vanderbilt Institute for Integrative Biosystems Research and Education (Viibre)*.

3.1.1

Preparação do coração para mapeamento óptico

Cinco coelhos brancos neozelandeses, com massas corporais entre 3 a 4 Kg, foram pré-anestesiados com quetamina intramuscular (50mg/Kg), seguido de injeção endovenosa de heparina (2000 unidades) e pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg para anestesia.

Os corações foram retirados rapidamente e conectados a um sistema de perfusão Langendorff e perfundidos por uma solução nutriente HEPES modificada (130mmol/L NaCl, 10mmol/L glucose, 5mmol/L KCl, 5mmol/L HEPES, 20mmol/L $C_2H_3O_2Na$, 1mmol/L $MgCl_2$ e 1mmol/L $CaCl_2$), saturada por meio de gás com 100% O_2 , ajustada para pH 7,35 a 7,45 com 1mol/L de NaOH e mantida a 37 graus Celsius por um sistema de controle de temperatura [58-61]. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os regulamentos para o uso de

animais em pesquisa e aprovados pelo comitê *Vanderbilt Institutional Animal Care and Use*.

O nódulo sino-atrial foi preservado, mantendo-se a atividade elétrica espontânea, e não foi realizada estimulação elétrica externa do tecido cardíaco. Após um intervalo de 20 minutos, para a estabilização do ritmo cardíaco, os corações foram corados adicionando di-4-ANEPPS (Molecular Probes, Eugene, Oregon) na solução de perfusão a uma concentração de $0,5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ e *Diacetyl monoxime* (DAM), para inibir contração muscular, a uma concentração de 15 mmol/L.

3.1.2

Montagem Experimental

Como fonte de iluminação para a excitação do corante potenciométrico foi utilizado um laser de estado sólido com comprimento de onda de 532 nm (Verdi, Coherent, Santa Clara, CA), expandido para aumentar a área de excitação. Uma lente foi utilizada de forma a aumentar as imagens capturadas em 1,6 vezes e um filtro passa-alta com frequência de corte de 607 nm (#25 Red, Tiffen, Hauppauge, NY) foi utilizado para eliminar reflexões da fonte de excitação. O sistema de detecção experimental consistiu em uma câmera CCD de alta sensibilidade [DS-12-16K5H Dalsa], capturando aproximadamente 490 quadros por segundo e com 128x128 pixels por quadro, permitindo uma resolução espacial de 0,4mm e uma resolução temporal de aproximadamente 2ms. A Figura 9 mostra um esquema da montagem experimental.

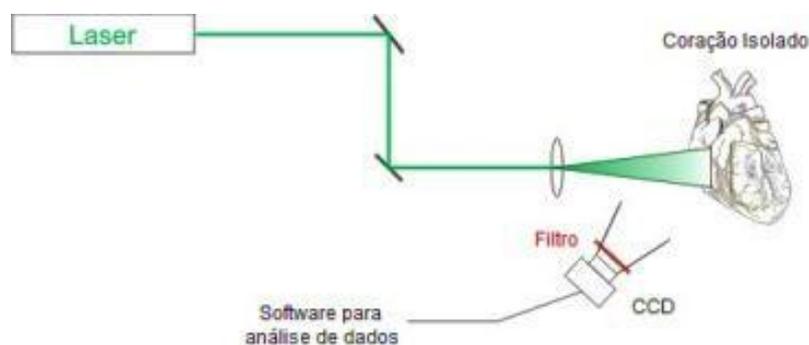


Figura 9: Esquema da montagem experimental para mapeamento óptico

O coração foi mantido em uma posição vertical fixa e o sistema de detecção e excitação possuía flexibilidade de movimentação para possibilitar o mapeamento do coração inteiro. O sinal de fluorescência foi adquirido com 12 bits pela câmera CCD e transferido por uma placa de aquisição de quadros (IC-PCI, Imaging Technology Inc., Bedford, MA) para o computador por dois segundos utilizando a montagem descrita acima para obtenção do potencial de ação por meio da razão entre a variação do sinal da fluorescência (ΔF) e seu valor de base (F): $-\Delta F/F$.

Uma foto de um coração isolado de coelho fixo em sistema Langerdoff durante um experimento de mapeamento da atividade elétrica realizado na Universidade de Vanderbilt é apresentada na Figura 10.

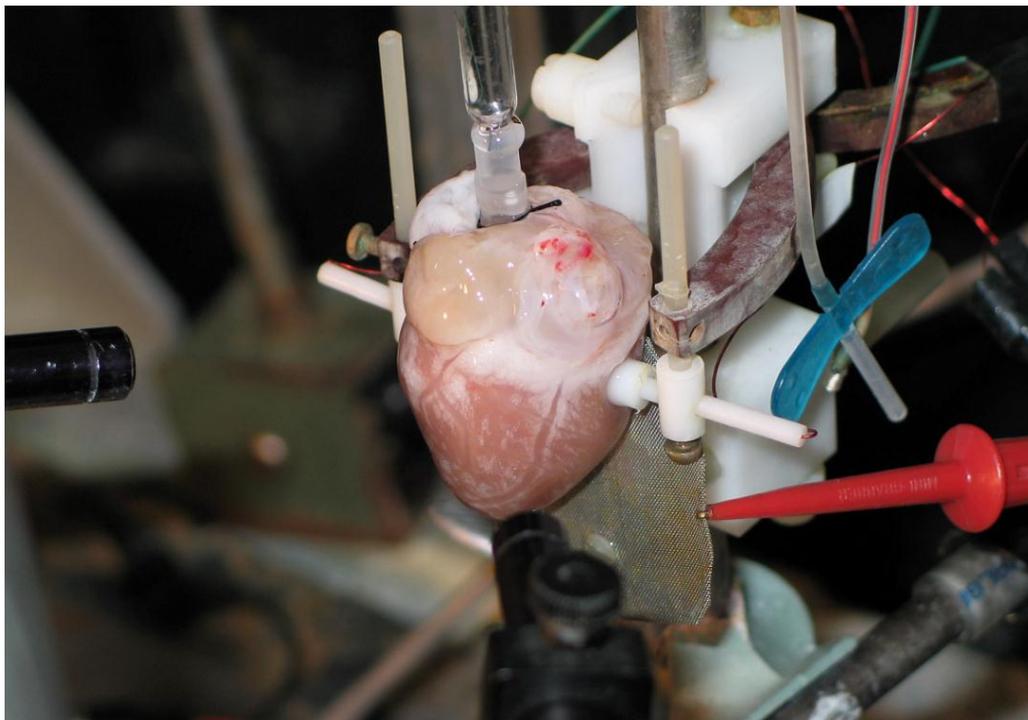


Figura 10: Coração isolado de coelho fixo em sistema Langerdoff na montagem experimental para imageamento óptico de sua atividade elétrica.

3.2

Simulação da resposta elétrica de células cardíacas

As descobertas de novos canais iônicos nas células cardíacas de mamíferos e os avanços das técnicas de *voltage-clamp* levaram a um aumento da

complexidade dos modelos matemáticos usados para descrever a eletrodinâmica cardíaca. Em 1977, Beeler e Reuter (modelo B-R) [62] desenvolveram um modelo usando quatro tipos de canais iônicos, cujas correntes foram descritas pelo formalismo do Hodgkin e Huxley, utilizando seis variáveis de portão. Em 1991, Luo e Rudy (modelo L-R) [20] apresentaram uma modelagem para os potenciais de ação de células do ventrículo de porco-da-índia, que incorporava novos resultados experimentais para a determinação das constantes de condutividade dos diferentes canais. O modelo L-R reformulou os coeficientes de abertura e fechamentos dos portões da corrente de sódio do modelo B-R e adicionou três correntes de potássio. Mais tarde, o modelo de Luo-Rudy foi aprimorado adicionando-se outras correntes, descrições matemáticas para trocadores e bombas e a dinâmica intracelular dos íons de sódio, potássio e cálcio [21-24]. Os modelos citados acima são modelos de monodomínio, os quais se caracterizam por serem contínuos e por desprezarem a influência do meio extracelular [29].

O balanço entre as correntes de despolarização e repolarização regula a voltagem da membrana durante o potencial de ação, sendo modulado pela concentração interna do íon de cálcio. O cálcio é extremamente importante na eletrofisiologia cardíaca e os mecanismos celulares de controle de sua concentração são de grande interesse na fisiologia celular. A concentração de cálcio no interior da célula é muito menor (aproximadamente $0,1 \mu\text{mol/L}$ em repouso) do que sua concentração no meio extracelular (aproximadamente 1mmol/L), gerando um alto gradiente do exterior para o interior da membrana celular. Este alto gradiente de concentração permite uma rápida mudança na concentração intracelular de cálcio, por meio da abertura de canais iônicos e fluxo passivo através da membrana. Porém, é necessário um gasto de energia para retirar íons de cálcio do meio intracelular e manter sua baixa concentração no citoplasma [29].

Existem dois meios principais para remoção de íons de cálcio do citoplasma da célula: remoção por bombas de íons e remoção por armazenamento em compartimentos internos da célula, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e retículo sarcoplasmático. Da mesma forma, existem dois meios principais para a entrada de íons de cálcio na célula: por meio da abertura de canais iônicos de cálcio e por meio da liberação dos íons de cálcio armazenados nos compartimentos internos da célula.

Um controle adicional para a redução da concentração dos íons de cálcio no citoplasma é feito por grandes proteínas moduladoras que se ligam aos íons, como as calsequestrinas e troponinas.

3.2.1

Simulação de uma célula ventricular do coração de coelho

O modelo matemático desenvolvido neste trabalho foi baseado nos modelos de Luo-Rudy [21-24], que simulam o potencial de ação de células do ventrículo do coração de mamíferos. A adaptação dos parâmetros das correntes iônicas para reproduzir o potencial de ação de células ventriculares do coração de coelhos saudáveis foi feita utilizando os dados experimentais de vários autores [39-45]. As dinâmicas intracelulares dos íons de sódio, potássio e cálcio também foram modificadas, incluindo o armazenamento e liberação do íon de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. A corrente transiente de saída I_{to} foi incorporada e dividida em uma formulação rápida ($I_{to,f}$) e uma formulação lenta ($I_{to,s}$) como descrito pelo modelo de Shannon e col. (2004) [46].

As correntes iônicas foram descritas pelo formalismo de Hodgkin e Huxley e a formulação detalhada de cada corrente, bem como os valores utilizados para os parâmetros de cada corrente e das dinâmicas iônicas intracelulares estão descritas a seguir.

O modelo possui 14 correntes iônicas denominadas: I_{Na} (corrente de sódio rápida); $I_{Ca,L}$ (corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-L); $I_{Ca,T}$ (corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-T); I_{Kr} (corrente de potássio ativada rapidamente); I_{Ks} (corrente de potássio ativada lentamente); I_{k1} (corrente de potássio independente do tempo); I_{Kp} (corrente de potássio de Plateau); $I_{to,f}$ corrente transiente de saída rápida; $I_{to,s}$ (corrente transiente de saída lenta); I_{NaCaX} (fluxo pelo trocador sódio-cálcio); $I_{Na,K}$ (corrente da bomba sódio-potássio); I_{pCa} (corrente da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático); $I_{Ca,b}$ (corrente de fundo de cálcio); e $I_{Na,b}$ (corrente de fundo de sódio). A corrente total, I_T , que atravessa a membrana celular é descrita por:

$$I_T = I_{Na} + I_{Na,b} + I_{Ca,L} + I_{NaCaX} + I_{pCa} + I_{Ca,T} + I_{Ca,b} + I_{Kr} \quad (9)$$

$$+ I_{Ks} + I_{K1} + I_{Kp} + I_{Na,K} + I_{to,f} + I_{to,s}$$

A corrente de sódio rápida (I_{Na}) incorpora os processos ativação (portão de ativação m), inativação (portão de inativação h) e inativação lenta (portão de inativação lenta h). Os parâmetros de I_{Na} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Shannon e col. (2004) [46]. Neste modelo a corrente de sódio rápida é descrita por:

$$E_{Na} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right); G_{Na} = 10;$$

$$\alpha_m = \frac{0.32(V + 47.13)}{1 - e^{-0.1(V+47.13)}}; \beta_m = 0.08e^{\frac{-V}{11}};$$

$$\alpha_h = \begin{cases} 0.135e^{\frac{(80+V)}{-6.8}} & \text{para } V < -40; \\ 0 & \text{para } V \geq -40 \end{cases};$$

$$\beta_h = \begin{cases} 3.56e^{0.079V} + 310000e^{0.35V} & \text{para } V < -40 \\ \frac{1}{0.13 \left(1 + e^{\frac{(V+10.66)}{-11.1}} \right)} & \text{para } V \geq -40; \end{cases}$$

$$\alpha_j = \begin{cases} (-127140e^{0.244V} - 0.00003474e^{-0.0439V}) \frac{V + 37.78}{(1 + e^{0.311(V+79.23)})} & \text{para } V < -40 \\ 0 & \text{para } V \geq -40 \end{cases}$$

$$\beta_j = \begin{cases} \frac{0.1212e^{-0.0105V}}{(1 + e^{-0.1378V+40.14})} & \text{para } V < -40; \\ 0 & \text{para } V \geq -40 \end{cases};$$

$$I_{Na} = G_{Na} m^3 h j (V - E_{Na})$$

A corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-L ($I_{Ca,L}$) incorpora processos de ativação (portão de ativação d), inativação (portão de inativação f) e inativação resultante da concentração de cálcio no meio interno (f_{ca} portão de inativação dependente da concentração de cálcio). Os parâmetros de $I_{Ca,L}$ foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como

base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste modelo a corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-L é dividida em três correntes, $I_{L,Ca}$, $I_{L,CaNa}$, $I_{L,CaK}$ que dependem da concentração de meia-saturação de cálcio, os coeficiente de atividade e a permeabilidade da membrana aos íons de sódio, cálcio e potássio e neste modelo são descritas por:

$$d_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V-10}{6.24}}}; f_{Ca} = \frac{1}{1 + \frac{[Ca]_i}{K_{m,Ca}}}; K_{m,Ca} = 0.006 \text{ mmol/L};$$

$$\tau_d = d_{\infty} \left(\frac{1 - e^{\frac{V+14.5}{6}}}{0.035(V+14.5)} \right); f_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+35}{8.6}}} + \frac{0.6}{1 + e^{\frac{50-V}{20}}};$$

$$\tau_f = \frac{1}{0.0197e^{-(0.0337V+14.5)^2} + 0.02};$$

$$\bar{I}_S = P_s Z_s^2 \left(\frac{VF^2}{RT} \right) \left(\frac{\left(\gamma_{[S]_i} [S]_i e^{\frac{Z_s VF}{RT}} - \gamma_{[S]_o} [S]_o \right)}{e^{\frac{Z_s VF}{RT}} - 1} \right),$$

Onde S inclui $[Ca^{2+}]$, $[Na^+]$, $[K^+]$ e

$$\gamma_{[Ca]_i} = 1, \quad \gamma_{[Ca]_o} = 0.341, \quad \gamma_{[Na]_i} = \gamma_{[Na]_o} = \gamma_{[K]_i} = \gamma_{[K]_o} = 0.75;$$

$$P_{Ca} = 5.4 \cdot 10^{-4} \frac{\mu A}{\mu F}, \quad P_{Na} = 6.75 \cdot 10^{-7} \frac{\mu A}{\mu F}, \quad P_K = 1.93 \cdot 10^{-7} \frac{\mu A}{\mu F};$$

$$I_{L,Ca} = d \cdot f \cdot f_{Ca} \cdot \bar{I}_{Ca};$$

$$I_{L,CaNa} = d \cdot f \cdot f_{Ca} \cdot \bar{I}_{Na};$$

$$I_{L,CaK} = d \cdot f \cdot f_{Ca} \cdot \bar{I}_K;$$

$$I_{Ca,L} = I_{L,Ca} + I_{L,CaNa} + I_{L,CaK}$$

A corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-T ($I_{Ca,T}$) incorpora processos de ativação (portão de ativação b) e inativação (portão de inativação g). Os parâmetros de $I_{Ca,T}$ foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste modelo a corrente de cálcio que atravessa canais do tipo-T é descrita por

$$G_{Ca,T} = 0.05, E_{Ca} = \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right);$$

$$b_\infty = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+14}{10.8}}};$$

$$\tau_b = 3.7 + \frac{6.1}{1 + e^{\frac{V+25}{4.5}}};$$

$$g_\infty = \frac{1}{1 + e^{\frac{V+60}{5.6}}};$$

$$\tau_g = \begin{cases} -0.875(V+12) & \text{para } V \leq 0 \\ 12 & \text{para } V > 0 \end{cases};$$

$$I_{Ca,T} = G_{Ca,T} b^2 g (V - E_{Ca})$$

A corrente de potássio ativada rapidamente (I_{Kr}) incorpora processos de ativação e inativação. Consideram-se os canais pelos quais atravessa a corrente de potássio ativada rapidamente distribuídos uniformemente pela membrana. Os parâmetros de I_{Kr} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23] com modificações por Puglisi e col. (2001) [41]. Neste modelo a corrente de potássio ativada rapidamente é descrita por

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right); G_{Kr} = 0.035 \sqrt{\frac{[K^+]_o}{5.4}}; X_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+50}{7.5}\right)}}$$

$$\tau_{xr} = \frac{1}{\frac{0.00138(V+7)}{1 - e^{-0.123(V+7)}} + \frac{0.00061(V+10)}{e^{0.145(V+10)} - 1}}; R_K = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+33}{22.4}\right)}}$$

$$I_{Kr} = G_{Kr} X_r R (V - E_K)$$

A corrente de potássio ativada lentamente (I_{Ks}) incorpora processos de ativação e inativação. Consideram-se os canais pelos quais atravessa a corrente de potássio ativada lentamente distribuídos uniformemente pela membrana e dependentes da concentração de sódio. Os parâmetros de I_{Ks} foram baseados em

células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste modelo a corrente de potássio ativada lentamente é descrita por:

$$E_{Ks} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_o + P_{Na,K}[Na^+]_o}{[K^+]_i + P_{Na,K}[Na^+]_i} \right);$$

$$P_{Na,K} = 0.01833;$$

$$G_{Ks} = 0.15 \left(1 + \frac{0.8}{1 + \left(\frac{0.2}{[Ca^{2+}]_i} \right)^3} \right);$$

$$X_{1s\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{(1.5-V)}{16.7}}}; \quad X_{2s\infty} = X_{1s\infty};$$

$$\tau_{x1s} = \frac{1}{\frac{0.0000719(V+30)}{1 - e^{-0.148(V+30)}} + \frac{0.00031(V+30)}{-1 + e^{0.0687V+30}}};$$

$$\tau_{x2s} = 4\tau_{x1s};$$

$$I_{Ks} = G_{Ks} X_{1s} X_{2s} (V - E_{Ks})$$

A corrente de potássio independente do tempo (I_{k1}) incorpora o processo de inativação (portão de inativação K_1) dependente da voltagem. O portão K_1 fecha quando a diferença de potencial entra o meio externo e interno é alto. Os parâmetros de I_{k1} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste modelo a corrente de potássio independente do tempo é descrita por:

$$E_{K1} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} \right); \quad G_{K1} = 0.540 \sqrt{\frac{[K^+]_o}{5.4}};$$

$$\alpha_{K1} = \frac{1.02}{1 + e^{0.238(V - E_{K1} - 59.213)}};$$

$$\beta_{K1} = \frac{0.06175e^{(V - E_{K1} - 59.31)} + 0.0394564e^{(V - E_{K1} + 5.476)}}{1 - 0.5143e^{(V - E_{K1} + 4.753)}};$$

$$K_1 = \frac{\alpha_{K1}}{\alpha_{K1} + \beta_{K1}};$$

$$I_{K1} = G_{K1} K_1 (V - E_{K1})$$

A corrente de potássio de Plateau (I_{Kp}) incorpora o processo de inativação (portão de inativação K_p) dependente da voltagem e independente da concentração de potássio. Os parâmetros de I_{Kp} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste modelo a corrente de potássio independente do tempo é descrita por:

$$K_p = \frac{1}{0.167224e^{7.488-V} + 1} ; G_{Kp} = 0.008 ;$$

$$I_{Kp} = G_{Kp} K_p (V - E_K)$$

A corrente transiente de saída (I_{to}) possui uma componente rápida ($I_{to,f}$) e uma componente lenta ($I_{to,s}$) com formulações similares porém constante de tempo do portão (τ_s e τ_f) muito diferentes. Os parâmetros de I_{to} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Shannon e col. (2004) [46]. Neste trabalho a corrente transiente de saída é descrita por:

$$G_{To,f} = 0.11 ; G_{To,s} = 0.04 ; R_{To} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+33.5}{10}\right)}} ;$$

$$X_{f\infty} = R_{To} ; X_{s\infty} = R_{To} ; Y_{f\infty} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V+33.5}{10}\right)}} ;$$

$$\tau_{Xf} = 3.5e^{\left(\frac{V}{30}\right)^2} + 1.5 ; \tau_{Yf} = \frac{20}{1 + e^{\left(\frac{V+33.5}{10}\right)}} + 20 ;$$

$$\tau_{Xs} = \frac{9}{1 + e^{\left(\frac{V+3}{15}\right)}} + 0.5 ; \tau_{Ys} = \frac{3000}{1 + e^{\left(\frac{V+60}{10}\right)}} + 30 ;$$

Componente rápida da corrente transiente de saída:

$$I_{To,f} = G_{To,f} X_f Y_f (V - E_K)$$

Componente lenta da corrente transiente de saída:

$$I_{To,s} = G_{To,s} X_s (Y_s + 0.5R_{To})(V - E_K)$$

$$I_{To} = I_{To,f} + I_{To,s}$$

A corrente que atravessa o trocador sódio-cálcio (I_{NaCaX}) é muito importante para manter os níveis de cálcio baixos quando a célula está em repouso

restaurando o equilíbrio na concentração intracelular de cálcio. Os parâmetros de I_{NaCaX} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste trabalho a corrente que atravessa o trocador sódio-cálcio é descrita por:

$$I_{NaCaX} = 0.00025e^{\frac{(0.15-1)VF}{RT}} \left(\frac{e^{\frac{VF}{RT}} ([Na^+]_i)^3 [Ca^{2+}]_o - ([Na^+]_o)^3 [Ca^{2+}]_i}{1 + 0.0001e^{\frac{(0.15-1)VF}{RT}} \left(e^{\frac{VF}{RT}} ([Na^+]_i)^3 [Ca^{2+}]_o + ([Na^+]_o)^3 [Ca^{2+}]_i \right)} \right)$$

A corrente da bomba sódio-potássio ($I_{Na,K}$) incorpora a dependência com a voltagem e concentração extracelular e intracelular de sódio e potássio. Os parâmetros de $I_{Na,K}$ foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste trabalho a corrente da bomba sódio-potássio é descrita por:

$$\sigma = \frac{e^{-1 + \frac{[Na^+]_o}{67.3}} - 1}{7} ; \bar{I}_{Na,K} = 1.5 \frac{\mu A}{\mu F} ;$$

$$f_{Na,K} = \frac{1}{1 + 0.1245e^{\frac{0.1VF}{RT}}} + 0.0365\sigma e^{-\frac{VF}{RT}} ;$$

$$K_{m,[Na]_i} = 1.2mmol/L ; \quad K_{m,[K]_o} = 1.5mmol/L ;$$

$$I_{Na,K} = \bar{I}_{Na,K} \cdot f_{Na,K} \frac{1}{1 + \frac{K_{m,[Na]_i}}{[Na^+]_i}} \cdot \frac{[K^+]_o}{[K^+]_o + K_{m,[K]_o}}$$

A corrente da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (I_{pCa}) é dependente da concentração intracelular de cálcio e é muito importante para diminuir a concentração de cálcio intracelular, armazenando o íon no retículo sarcoplasmático, quando a célula está em repouso. Os parâmetros de I_{pCa} foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação da corrente tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste trabalho a corrente da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático é descrita por:

$$\bar{I}_{p,Ca} = 1.15 \frac{\mu A}{\mu F} ; K_{m,pCa} = 0.005mmol/L ;$$

$$I_{p,Ca} = \frac{\bar{I}_{p,Ca}[Ca^{2+}]_i}{K_{m,pCa} + [Ca^{2+}]_i}$$

As correntes de fundo de sódio ($I_{Na,b}$) e cálcio ($I_{Ca,b}$) são independentes do tempo e possuem pequenas variações que são dependentes diretamente da voltagem. Os parâmetros de $I_{Na,b}$ e $I_{Ca,b}$ foram baseados em células cardíacas de coelho e a formulação das correntes tem como base o modelo de Luo-Rudy [23]. Neste trabalho as correntes de fundo de sódio e cálcio são descritas por:

$$G_{Ca,b} = 0.003016, \quad E_{Ca,b} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i};$$

$$I_{Ca,b} = G_{Ca,b}(V - E_{Ca,b})$$

$$G_{Na,b} = 0.004;$$

$$I_{Na,b} = G_{Na,b}(V - E_{Na})$$

A dinâmica do íon de cálcio no modelo desenvolvido inclui a liberação de cálcio armazenado no interior do retículo sarcoplasmático, dividido em duas regiões denominadas retículo sarcoplasmático em rede (NSR) e retículo sarcoplasmático de junção (JSR). Essa descrição é feita por meio de quatro correntes: I_{tr} , I_{leak} , I_{up} e I_{rel} , que representam a corrente de translocação entre NSR e JSR, corrente de vazamento do NSR, corrente da bomba de entrada de cálcio no NSR e corrente de liberação de cálcio do JSR, respectivamente. O modelo desenvolvido também inclui a liberação de cálcio ligado às proteínas moduladoras troponina, calsequestrina e Ca^{2+} -calmodulina quinase 2 (CaMKII). Neste trabalho a dinâmica do íon de cálcio foi baseada no modelo de Luo-Rudy [23] e é descrita por:

$$G_{rel} = \frac{150}{1 + e^{\left(\frac{I_{Ca,L} + I_{Ca,b} + I_{p,Ca} + I_{Ca,T} - 2I_{NaCaX} + 5}{0.9} \right)}};$$

$$RyR_{open} = \frac{1}{1 + e^{\frac{4-t_r}{0.5}}};$$

$$RyR_{close} = 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{4-t_r}{0.5}}};$$

$$I_{rel} = G_{rel} \cdot RyR_{open} \cdot RyR_{close} ([Ca^{2+}]_{JSR} - [Ca^{2+}]_i);$$

$$I_{up} = \bar{I}_{up} \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_{m,up}}, \quad \bar{I}_{up} = 0.00875, \quad K_{m,up} = 0.00092 ;$$

$$K_{leak} = \frac{\bar{I}_{up}}{[Ca^{2+}]_{NSR}} ; [Ca^{2+}]_{NSR_{initial}} = [Ca^{2+}]_{JSR_{initial}} = 1.179 \text{ mmol/L} ;$$

$$I_{leak} = K_{leak}[Ca^{2+}]_{NSR} ; I_{tr} = \frac{[Ca^{2+}]_{NSR} - [Ca^{2+}]_{JSR}}{\tau_{tr}},$$

$$\tau_{tr} = 180, \quad t_{initial} = 1000 \text{ ms}$$

O modelo desenvolvido neste trabalho utiliza parâmetros fisiológicos (concentrações iônicas, correntes iônicas, fatores de saturação, permeabilidades da membrana e etc.) adaptados e atualizados para reproduzir o potencial de ação de cardiomiócitos ventriculares de coelhos com atividade elétrica normal. A modelagem foi realizada utilizando a linguagem de programação C e o programa Microsoft Visual C++ 2010 Express.

A Figura 11 apresenta um esquema representando todos os canais utilizados e os componentes descritos na dinâmica detalhada do íon de cálcio do modelo desenvolvido neste trabalho.

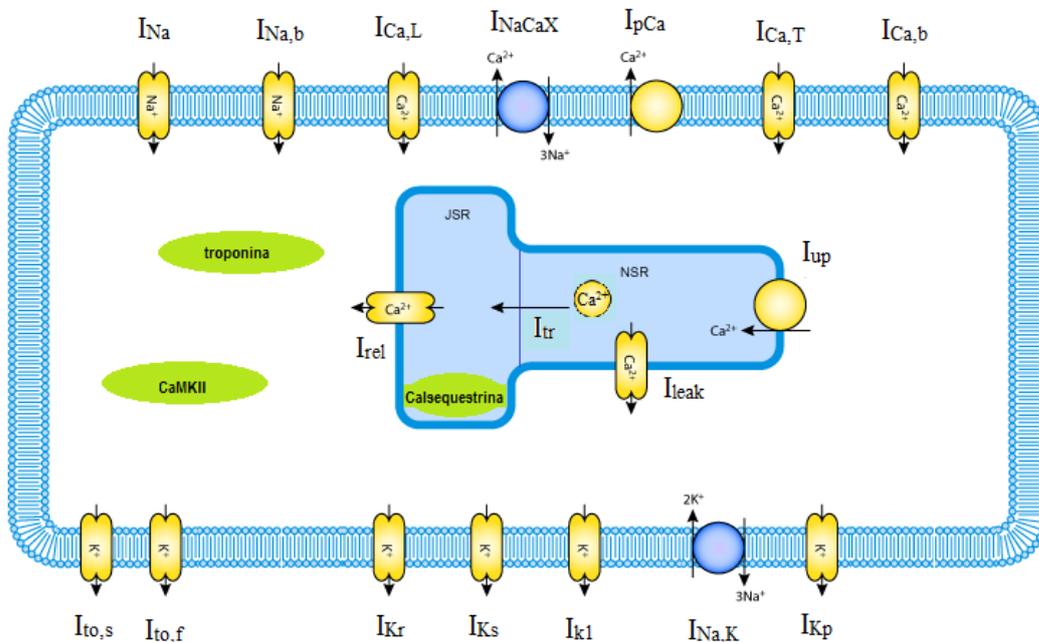


Figura 11: Representação das correntes iônicas que compõem a modelagem utilizada para o cálculo do potencial de ação de uma célula ventricular de coração de coelho.

Para todas as simulações foram aplicados estímulos elétricos por 0,5ms, com magnitude de $80\mu\text{A}/\mu\text{F}$ (I_{st}). Os valores utilizados para as concentrações iônicas iniciais no meio extracelular foram determinados pelas concentrações iônicas reais no exterior das células e foram de: $[\text{Na}^+]_o = 140 \text{ mmol/L}$; $[\text{K}^+]_o = 5,4 \text{ mmol/L}$ e $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1,8 \text{ mmol/L}$. O modelo foi integrado pelo método de Euler com um passo temporal de 0,01ms [63].

3.2.2

Simulação de um grupo de 125 células ventriculares do coração de coelho

O potencial de ação óptico obtido por um único pixel do sistema de detecção é gerado por um grupo de células do coração. O tamanho desse grupo será definido pela resolução espacial da instrumentação utilizada. Para estudar o efeito dessa integração espacial foi feita a simulação de um potencial de ação médio.

O potencial de ação médio simulado foi gerado por um grupo de 125 células cardíacas de tamanho $0,1 \times 0,02 \text{ mm}$, ocupando uma área quadrada de $0,5 \times 0,5 \text{ mm}$, correspondente a uma resolução espacial de $0,5\text{mm}$. As células foram distribuídas uniformemente de forma horizontal. Devido à anisotropia da velocidade de propagação no tecido cardíaco, foi calculado o deslocamento temporal do potencial de ação de cada célula, considerando a célula central com atraso nulo. A Figura 12 mostra um esquema da distribuição das 125 células e atraso no estímulo recebido por cada célula indicando a célula sem atraso em preto, onde δ_L e δ_T são os coeficientes de atraso (em ms) para uma propagação lenta (vertical) e rápida (horizontal), respectivamente.

x	1	2	3	4	5
1	$-12\delta_L - 2\delta_T$	$-12\delta_L - \delta_T$	$-12\delta_L$	$-12\delta_L + \delta_T$	$-12\delta_L + 2\delta_T$
2	$-11\delta_L - 2\delta_T$	$-11\delta_L - \delta_T$	$-11\delta_L$	$-11\delta_L + \delta_T$	$-11\delta_L + 2\delta_T$
3	$-10\delta_L - 2\delta_T$	$-10\delta_L - \delta_T$	$-10\delta_L$	$-10\delta_L + \delta_T$	$-10\delta_L + 2\delta_T$
4	$-9\delta_L - 2\delta_T$	$-9\delta_L - \delta_T$	$-9\delta_L$	$-9\delta_L + \delta_T$	$-9\delta_L + 2\delta_T$
5	$-8\delta_L - 2\delta_T$	$-8\delta_L - \delta_T$	$-8\delta_L$	$-8\delta_L + \delta_T$	$-8\delta_L + 2\delta_T$
6	$-7\delta_L - 2\delta_T$	$-7\delta_L - \delta_T$	$-7\delta_L$	$-7\delta_L + \delta_T$	$-7\delta_L + 2\delta_T$
7	$-6\delta_L - 2\delta_T$	$-6\delta_L - \delta_T$	$-6\delta_L$	$-6\delta_L + \delta_T$	$-6\delta_L + 2\delta_T$
8	$-5\delta_L - 2\delta_T$	$-5\delta_L - \delta_T$	$-5\delta_L$	$-5\delta_L + \delta_T$	$-5\delta_L + 2\delta_T$
9	$-4\delta_L - 2\delta_T$	$-4\delta_L - \delta_T$	$-4\delta_L$	$-4\delta_L + \delta_T$	$-4\delta_L + 2\delta_T$
10	$-3\delta_L - 2\delta_T$	$-3\delta_L - \delta_T$	$-3\delta_L$	$-3\delta_L + \delta_T$	$-3\delta_L + 2\delta_T$
11	$-2\delta_L - 2\delta_T$	$-2\delta_L - \delta_T$	$-2\delta_L$	$-2\delta_L + \delta_T$	$-2\delta_L + 2\delta_T$
12	$-\delta_L - 2\delta_T$	$-\delta_L - \delta_T$	$-\delta_L$	$-\delta_L + \delta_T$	$-\delta_L + 2\delta_T$
13	$-2\delta_T$	$-\delta_T$	0	$+\delta_T$	$+2\delta_T$
14	$+\delta_L - 2\delta_T$	$+\delta_L - \delta_T$	$+\delta_L$	$+\delta_L + \delta_T$	$+\delta_L + 2\delta_T$
15	$+2\delta_L - 2\delta_T$	$+2\delta_L - \delta_T$	$+2\delta_L$	$+2\delta_L + \delta_T$	$+2\delta_L + 2\delta_T$
16	$+3\delta_L - 2\delta_T$	$+3\delta_L - \delta_T$	$+3\delta_L$	$+3\delta_L + \delta_T$	$+3\delta_L + 2\delta_T$
17	$+4\delta_L - 2\delta_T$	$+4\delta_L - \delta_T$	$+4\delta_L$	$+4\delta_L + \delta_T$	$+4\delta_L + 2\delta_T$
18	$+5\delta_L - 2\delta_T$	$+5\delta_L - \delta_T$	$+5\delta_L$	$+5\delta_L + \delta_T$	$+5\delta_L + 2\delta_T$
19	$+6\delta_L - 2\delta_T$	$+6\delta_L - \delta_T$	$+6\delta_L$	$+6\delta_L + \delta_T$	$+6\delta_L + 2\delta_T$
20	$+7\delta_L - 2\delta_T$	$+7\delta_L - \delta_T$	$+7\delta_L$	$+7\delta_L + \delta_T$	$+7\delta_L + 2\delta_T$
21	$+8\delta_L - 2\delta_T$	$+8\delta_L - \delta_T$	$+8\delta_L$	$+8\delta_L + \delta_T$	$+8\delta_L + 2\delta_T$
22	$+9\delta_L - 2\delta_T$	$+9\delta_L - \delta_T$	$+9\delta_L$	$+9\delta_L + \delta_T$	$+9\delta_L + 2\delta_T$
23	$+10\delta_L - 2\delta_T$	$+10\delta_L - \delta_T$	$+10\delta_L$	$+10\delta_L + \delta_T$	$+10\delta_L + 2\delta_T$
24	$+11\delta_L - 2\delta_T$	$+11\delta_L - \delta_T$	$+11\delta_L$	$+11\delta_L + \delta_T$	$+11\delta_L + 2\delta_T$
25	$+12\delta_L - 2\delta_T$	$+12\delta_L - \delta_T$	$+12\delta_L$	$+12\delta_L + \delta_T$	$+12\delta_L + 2\delta_T$

Figura 12: Esquema da distribuição do grupo de 125 células para cálculo do potencial de ação médio gerado (δ_L e δ_T em ms).

Considerando a anisotropia da velocidade de propagação do estímulo entre células cardíacas e os valores para as velocidades no eixo paralelo (horizontal) e no eixo perpendicular (vertical) ao eixo de propagação preferencial para o tecido cardíaco da superfície do ventrículo do coração do coelho tem-se: $\delta_L = 0,2$ ms e $\delta_T = 0,35$ ms. Dessa forma, utilizando o esquema mostrado na Figura 12, pode-se calcular o atraso no início do potencial de ação de cada célula do grupo e obter o potencial de ação médio gerado pelas 125 células.

O potencial de ação de cada célula foi gerado como descrito na simulação de uma célula ventricular do coração de coelho (3.2.1) incorporando o atraso calculado no estímulo recebido por cada célula pertencente ao grupo de 125 células. Desta forma o potencial de ação de cada célula do grupo apresentou-se levemente deslocado no tempo do potencial de ação da célula central (com atraso

nulo) [63]. O potencial de ação médio simulado para o grupo foi obtido pela média móvel destes 125 potenciais de ação simulados.

3.3

Processamento de sinais experimentais e simulados

Neste trabalho foram utilizados três tipos de processamento: aplicação de filtros Butterworth para a redução do ruído do sinal, aplicação de interpolação por *Cubic Spline* e *Spline Fit* para aumentar a taxa de amostragem do sinal, e aplicação da simulação do processo de binagem para investigação do efeito da redução de resolução espacial em mapas ópticos e registros experimentais.

3.3.1

Filtragem do Ruído por Filtros Butterworth.

Com o objetivo de definir o melhor procedimento para redução do ruído contido nos potenciais de ação ópticos obtidos por meio de mapeamento da fluorescência, foram estudados os efeitos da aplicação de filtros digitais em potenciais de ação simulados. Para esse estudo foram configurados, por meio de simulação, potenciais de ação gerados por uma célula e por um grupo de 125 células, com intervalo entre os pontos de 2ms para reproduzir a taxa de amostragem do sinal experimental. Nestes sinais simulados foi incorporado um ruído branco gaussiano gerado pelo programa MATLAB.

Os potenciais de ação simulados e adicionados de ruído foram submetidos à aplicação de filtros digitais por corte de frequência Butterworth (com diferentes ordens e frequências de corte) e filtros por média móvel e mediana.

O efeito do filtro digital aplicado foi avaliado tanto com relação à taxa de redução do ruído contido no sinal, quanto à morfologia do potencial de ação.

Por meio de análises qualitativas verificou-se que o filtro do tipo Butterworth mostrou-se mais eficiente na redução do ruído do que outras abordagens, como a mediana, sem causar alterações significativas na morfologia do potencial de ação simulado com ruído no qual foi aplicado. As frequências de

corde utilizadas para o estudo foram de 75 Hz, 88 Hz e 100 Hz para filtros de ordem 2, 4 e 6.

Para avaliar das alterações na morfologia dos potenciais de ação, os sinais com ruído filtrados digitalmente foram comparados com os sinais simulados originais (sem adição de ruído) para uma célula e para um grupo de 125 células. Esta comparação foi realizada de forma qualitativa, pela morfologia dos potenciais de ação, e quantitativa, por meio da análise de parâmetros morfológicos do *upstroke* do potencial de ação, conforme descrito na seção 3.4.

3.3.2

Interpolação por Cubic Spline e Spline Fit

Com o objetivo de melhorar a estimativa de parâmetros do potencial de ação obtido dos dados experimentais adquiridos por mapeamento óptico da atividade elétrica, dois métodos de interpolação foram estudados: interpolação por *Cubic Spline* e *Spline Fit*. Novamente, é importante que o processo de interpolação aplicado não modifique a morfologia do potencial de ação ao aumentar sua resolução temporal, portanto foi realizada a análise dos efeitos dos métodos de interpolação por meio da aplicação das interpolações nos potenciais de ação simulados. Para este estudo, utilizou-se como referência os sinais simulados de uma única célula e de um grupo de células com resoluções temporais de 0,1ms, 0,2ms, 0,3ms, 0,4ms, 0,5ms, 1,0ms e 2,0ms. Os métodos de interpolação por *Cubic Spline* e *Spline Fit* foram utilizados nos potenciais de ação simulados com resolução temporal de 2,0ms resultando em sinais simulados interpolados digitalmente com resoluções temporais de 0,1ms, 0,2ms, 0,3ms, 0,4ms, 0,5ms e 1,0ms.

As interpolações por *Cubic Spline* e *Spline Fit* foram realizadas no software MATLAB. Nas interpolações por *Spline Fit* utilizou-se duas escolhas do parâmetro *break*, um único *break* para todo o potencial de ação ou dois valores *break* diferenciados: um valor alto para o *upstroke* (evitando suavizações das rápidas mudanças do potencial) e um valor médio para o resto do potencial de ação. Para determinar o melhor valor dos parâmetros *break*, realizou-se um estudo com registros de potenciais de ação simulados e potenciais de ação ópticos (experimentais). Para os potenciais simulados foram escolhidos *break* de 1600 e 400 e para os potenciais de ação ópticos foram escolhidos *break* de 800 e 300 (devido à quantidade de ciclos contidos em cada sinal).

Para avaliar alterações na morfologia dos potenciais de ação, os sinais digitalmente interpolados foram comparados com os sinais simulados (não processados) de resolução temporal equivalente. Esta comparação foi realizada de forma qualitativa, pela morfologia dos potenciais de ação, e quantitativa, por meio da análise de parâmetros morfológico do *upstroke* do potencial de ação, conforme descrito na seção 3.4.

3.3.3

Redução da resolução espacial por binagem

A simulação do processo de binagem ocorrido em uma câmera CCD tem como objetivo investigar os efeitos da resolução espacial do mapeamento óptico na visualização e interpretação da propagação da atividade elétrica e na morfologia do potencial de ação óptico.

O protocolo de simulação criado para reproduzir o processo de binagem de uma câmera CCD consistiu na combinação do sinal de fluorescência medido em pixels adjacentes em um único pixel maior. Este procedimento foi realizado no software MATLAB e aplicado nos dados experimentais obtidos por mapeamento óptico da ativação elétrica de coração isolado de coelho, combinando os sinais adquiridos por pixels adjacentes de forma a obter resoluções espaciais reduzidas. O processo de binagem foi utilizado para as combinações de 2x2, 3x3, 4x4 e 8x8 pixels, resultando em imagens com 64x64, 42x42, 32x32 e 16x16 pixels por quadro, respectivamente. Consequentemente, esse processo reduziu a resolução espacial original de 0,4mm para 0,8mm, 1,2mm, 1,6mm e 3,2mm respectivamente.

3.4

Indicadores de distorção do potencial de ação

Para análise dos efeitos dos processamentos digitais aplicados em sinais simulados e experimentais foram utilizados parâmetros morfológicos do *upstroke* do potencial de ação. Da mesma forma, a análise da influência da resolução temporal e espacial nos potenciais ópticos obtidos por mapeamento da fluorescência foi realizada por meio dos mesmos parâmetros morfológicos do *upstroke* do potencial de ação.

Os parâmetros morfológicos do *upstroke* do potencial de ação escolhidos para esse estudo foram:

- O instante no qual o *upstroke* do potencial de ação tem sua máxima derivada no tempo ($T_{S(\max)}$ para sinais simulados e $T_{F(\max)}$ para sinais experimentais)
- O valor da voltagem no instante no qual o *upstroke* do potencial de ação tem sua máxima derivada no tempo ($V_{S(\max)}$ para sinais simulados e $V_{F(\max)}$ para sinais experimentais)
- A fração do *upstroke* no qual o *upstroke* do potencial de ação tem sua máxima derivada no tempo (V_S^* para sinais simulados e V_F^* para sinais experimentais). Dado por:

$$V_x^* = \frac{V_{x(\max)} - V_{\min_upstroke}}{V_{\max_upstroke} - V_{\min_upstroke}}, \quad (10)$$

onde x pode ser S ou F para sinais simulados ou experimentais, respectivamente.

A Figura 13 apresenta o *upstroke* de um potencial de ação simulado para um grupo de 125 células com esses parâmetros em destaque, para melhor entendimento.

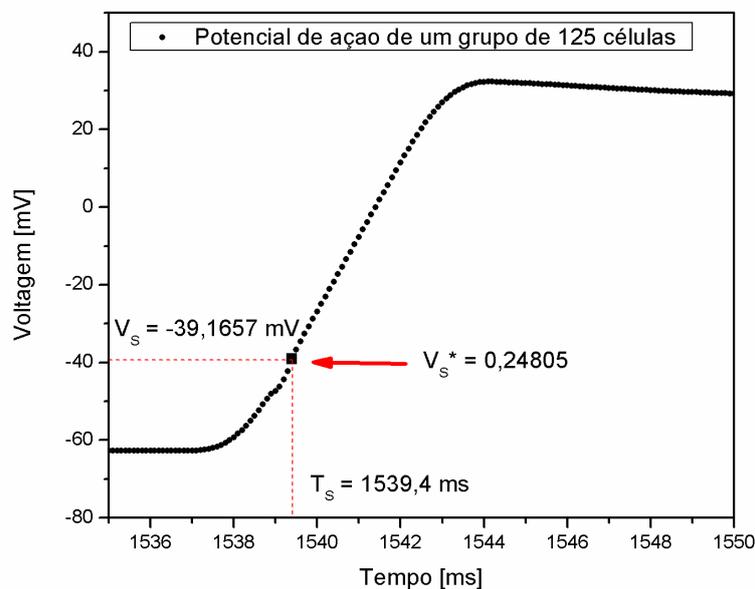


Figura 13: Representação dos parâmetros $T_{S(\max)}$, $V_{S(\max)}$ e V_S^* para o *upstroke* de um potencial de ação médio simulado para um grupo de 125 células.

Esses parâmetros do *upstroke* são importantes para a determinação da velocidade de condução superficial da frente de onda e sua orientação média no volume do tecido cardíaco [12]. Recentemente, foi estabelecida uma relação linear entre o ângulo da orientação da frente de onda e a morfologia do *upstroke* obtido utilizando potenciais de ação ópticos por meio de mapeamento da fluorescência [10-11,13-14,64].

Recentes pesquisas detalharam correlações entre a morfologia do *upstroke* e a orientação da frente de onda da propagação da atividade elétrica, determinando a relação linear entre V_F^* e o parâmetro $\bar{\phi}$, definido como o ângulo médio óptico, em relação à superfície da frente de onda que está se propagando e concluíram que valores de V_F^* próximos a 0,4 indicam frentes de onda movendo-se paralelas à superfície do coração, valores de V_F^* próximos a 0,2 indicam frentes de onda que se afastam da superfície do coração e valores de V_F^* próximos a 0,6 indicam frentes de onda que se aproximam da superfície cardíaca [10-14].