

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação**  
**Departamento de Engenharia Biomédica**

**Título**

**TAQUIARRITMIA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA EM ÁTRIOS  
ISOLADOS DE RATOS: ESTUDO DE PROTOCOLOS ESTIMULATÓRIOS E  
MECANISMOS CELULARES.**

**Autor**

**NIVALDO ZAFALON JUNIOR**

**Orientadora**

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ROSANA ALMADA BASSANI**

**Co-orientador**

**Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação  
para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.**

**Campinas, Junho de 2001  
S.P. – Brasil**

## TERMO DE RESPONSABILIDADE SOBRE A TESE

AUTOR: Zafalon, Nivaldo Jr

ORIENTADORA: Bassani, Rosana Almada

TÍTULO: Taquiarritmia induzida por estimulação elétrica em átrios isolados de ratos: estudo de protocolos estimulatórios e mecanismos celulares.

GRADUAÇÃO: Mestrado

EDITORA: UNICAMP

ANO: 2001-04-25

Nós, responsáveis pela obra acima relacionada, **AUTORIZAMOS** a reprodução **TOTAL** da mesma a partir de **01/06/2003**.

Obs: \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Orientador

\_\_\_\_\_  
Autor

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos, e ao meu amor Fernanda.*

## Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma, ao longo do tempo em que estive envolvido com este trabalho, me ajudaram não somente a superar os desafios técnicos, mas também a sustentar o ímpeto que até aqui me trouxe.

De maneira especial, agradeço a Dra. *Rosana Almada Bassani* que transpondo o papel de orientadora, demonstrou-se uma excelente didata. Ao Dr. *José Wilson Magalhães Bassani*, especialmente pelos ensinamentos que fui capaz de tirar das entrelinhas de suas observações.

Ao Prof. Dr. *Carlos Marcelo G. de Godoy*, pelo apoio na implantação da técnica e, especialmente, pela cessão de sua câmara de incubação.

Agradeço, também, aos Professores do Departamento de Engenharia Biomédica, aos técnicos e estagiários dos laboratórios de apoio a pesquisa básica e apoio ao desenvolvimento, especialmente ao Eng<sup>o</sup>. *Sérgio Paulo Moura*, Sr. *Gilson Barbosa Maia Jr.* e Srtas. *Michelle Roveri* e *Elisângela S. Oliveira*, pelo excelente apoio técnico.

Ao amigo *Sandro Aparecido Ferraz* que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis. Ao amigo, de longa data, *Cezar Augusto Roveran*. Aos amigos *Ruyther*, *Cláudio*, *Beatriz*, *Hayran*, *Ricardo*, *Joaquim* e *Pedro* que, além de contribuições técnicas, com sua amizade, me deram forças espirituais indispensáveis.

A *Marlene Rodrigues Zafalon*, pelo apoio e preocupação.

Por fim, agradeço à Diretoria do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP, pelo acesso a suas instalações e recursos, ao CAPES, pela Bolsa de Mestrado, e à FAPESP, pelo apoio financeiro ao Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (CEB/UNICAMP), onde este trabalho foi realizado.

## RESUMO

Embora haja indicações na literatura de que a estimulação para-simpática tenha efeito facilitatório sobre a indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência, não é certa a compreensão da influência da estimulação simpática sobre a ocorrência deste fenômeno. No presente trabalho, desenvolvemos um sistema para estimulação elétrica por campo e para registro do eletrograma em átrio isolado de rato. Utilizamos este sistema para estudar a influência dos parâmetros estimulatórios sobre a indução de taquiarritmia atrial, com a proposta de um novo protocolo estimulatório, mais efetivo. Estudamos também a eficiência de agentes anti-arrítmicos clássicos, buscando maior entendimento dos mecanismos celulares envolvidos com os efeitos da estimulação simpática e para-simpática sobre a geração de arritmias neste modelo experimental.

Para quantificação dos resultados, definimos o índice de taquiarritmia (IT), que representa a fração dos trens estimulatórios aplicados capaz de induzir taquiarritmia. Observamos que, na presença de carbacol (CCh, 0,6  $\mu$ M), há redução significativa da frequência atrial espontânea (FAE), mas aumento de IT ( $p < 0,05$ ). Na presença de isoproterenol (ISO, 10 nM), ao contrário, observamos aumento de FAE e queda de IT ( $p < 0,05$ ). No entanto, ISO não foi efetivo quando aplicado na presença de CCh. Isobutil-metilxantina (IBMX, 0,1 mM) foi utilizada para aumentar os níveis intracelulares de cAMP (AMP cíclico), por inibição das fosfodiesterases. IBMX elevou FAE de modo semelhante ao ISO, e também reduziu IT, tanto na ausência, quanto na presença de CCh ( $p < 0,05$ ). Verapamil (VERA, 1  $\mu$ M), um anti-arrítmico utilizado na clínica médica e conhecido bloqueador de canais de cálcio, reduziu IT apenas quando aplicado isoladamente, mas não na presença de CCh. Por fim, testamos em nosso modelo experimental o efeito do amiodarone (AMI, 1-10  $\mu$ M), também utilizado clinicamente, verificando queda de FAE, mas redução de IT, tanto na ausência, quanto na presença de CCh ( $p < 0,05$ ).

Da análise dos resultados, concluímos que existe antagonismo das vias colinérgica e adrenérgica, com relação à facilitação da indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência, e que este antagonismo parece estar associado ao controle dos níveis intracelulares de cAMP. Nossos resultados indicam ainda um importante envolvimento dos canais de potássio sensíveis a ACh no aumento de IT associado a estimulação colinérgica muscarínica. A corrente através destes canais provavelmente afeta a refratariedade do tecido, facilitando o estabelecimento de circuitos reentrantes.

## ABSTRACT

Although it has been reported that parasympathetic stimulation facilitates atrial tachyarrhythmia induction by high-frequency electrical stimulation, the influence of sympathetic stimulation on this phenomenon is not clear. In the present work, we developed a setup for electrical field stimulation and electrogram recording in the isolated rat atrium. The setup was used to study the influence of stimulatory parameters on atrial tachyarrhythmia induction. We also developed a novel, more effective stimulation protocol. In addition, we tested some classical anti-arrhythmic agents, aiming at further understanding of the cellular mechanisms involved in the effects of parasympathetic and sympathetic stimulation on arrhythmias induction in our experimental model.

For quantitation of arrhythmia inductibility, we used a tachyarrhythmia induction index (IT), which is the fraction of the number of stimulatory trains applied to the tissue which evoked arrhythmia. We observed that carbamylcholine (CCh, 0.6  $\mu$ M) reduced significantly the spontaneous atrial rate (FAE), but increased IT ( $p < 0,05$ ). On the other hand, isoproterenol (ISO, 10 nM) increased FAE and decreased IT ( $p < 0,05$ ). However, ISO was not effective when applied to CCh-treated preparations. Isobutyl-methylxanthine (IBMX, 0.1mM) was used to increase intracellular cAMP (cyclic AMP) levels due to phosphodiesterase inhibition. IBMX increased FAE in a similar manner as ISO did, and reduced IT in the absence and the presence of CCh ( $p < 0,05$ ). Verapamil (VERA, 1  $\mu$ M), a calcium-channel blocker with anti-arrhythmic properties, reduced IT only when applied in the absence of CCh. Finally, we tested amiodarone (AMI, 1–10  $\mu$ M), another drug widely used in medical clinics, on our experimental model. AMI decreased both FAE and IT, and was effective both in the absence and in the presence of CCh ( $p < 0,05$ ).

From this analysis, we concluded that there is antagonism between the cholinergic and adrenergic pathways, regarding the facilitation of arrhythmia induction by high frequency electrical stimulation. This antagonism seems to be related to control of the intracellular cAMP level. Our findings still point out an important involvement of the ACh-dependent potassium channels in the muscarinic-induced increased in IT. The current through these channels probably affects atrial refractoriness, which may facilitate the establishment of reentrant circuits.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1	Arritmias Atriais .....	09
1.2	Mecanismos Propostos para Geração e Manutenção de Taquiarritmia atriais .....	10
1.2.1	Desenvolvimento de focos ectópicos e atividade elétrica espontânea.....	10
1.2.2	Desenvolvimento de circuitos reentrantes .....	11
1.3	Escopo do Presente Trabalho .....	12
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>16</b>
3.1	Animais .....	17
3.2	Preparação Biológica .....	17
3.3	Montagem Experimental .....	17
3.3.1	Registro do eletrograma atrial .....	18
3.3.2	Estimulação elétrica .....	19
3.4	Protocolo Experimental de Montagem do Átrio Direito .....	19
3.5	Indução de Taquiarritmia Atrial por Estimulação Elétrica .....	22
3.5.1	Definições .....	25
3.5.2	Influência dos parâmetros estimulatórios sobre a indução de taquiarritmia .....	25
3.5.2.1	Número de pulsos por trem estimulatório .....	25
3.5.2.2	Frequência do trem estimulatório .....	25
3.5.2.3	Teste do protocolo de trens triplos de pulsos .....	25
3.5.3	Influência de fármacos sobre a indução de taquiarritmia .....	26
3.5.3.1	Efeito da carbamilcolina (CCh) .....	26
3.5.3.2	Efeito do isoproterenol (ISO) .....	27
3.5.3.3	Efeito da L-arginina (L-Arg) .....	27
3.5.3.4	Efeito da 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) .....	28
3.5.3.5	Efeito do amiodarone (AMI) .....	29
3.5.3.6	Efeito do verapamil (VERA) .....	29
3.6	Soluções .....	29
3.7	Análise Estatística .....	31
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
4.1	Sistema Para Estimulação Atrial por Campo Elétrico .....	33
4.2	Taquiarritmia atrial produzida por estimulação elétrica .....	34
4.3	Influência dos parâmetros estimulatórios sobre a indução de taquiarritmia atrial .....	35
4.3.1	Números de pulsos por trem estimulatório .....	35
4.3.2	Frequência do trem estimulatório .....	36
4.3.3	Padrão de apresentação de pulso (teste do trem triplo) .....	37

4.4	Influência de Fármacos sobre a Indução de Taquiarritmia .....	38
4.4.1	Efeitos da carbamilcolina .....	38
4.4.2	Efeitos do isoproterenol .....	40
4.4.3	Efeitos da (3-isobutil-1-metilxantina) e da cafeína .....	42
4.4.4	Efeitos do verapamil .....	47
4.4.5	Efeitos do amiodarone .....	49
4.4.6	Efeitos da L-arginina .....	51
<b>5</b>	<b>Discussão e Conclusões .....</b>	<b>55</b>
5.1	Montagem Experimental para Indução de Taquiarritmia Atrial por Estimulação Elétrica .....	56
5.2	Influência dos Parâmetros Estimulatórios sobre a Indução de Taquiarritmia .....	57
5.3	Estudo Farmacológico da Taquiarritmia Atrial Induzida por Estimulação Elétrica .....	58
5.3.1	Efeito da estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos ..	58
5.3.2	Efeito da estimulação de receptores $\beta$ -adrenérgicos .....	62
5.3.3	Análise de outros mecanismos celulares relevantes à indução de taquiarritmia: Efeitos de agentes anti-arrítmicos .....	64
<b>6</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>69</b>



# Capítulo 1

## Introdução

Não há como comparar a importância vital entre os diversos sistemas responsáveis pela manutenção da vida. Não obstante, dada a natureza integrativa e provedora do sistema circulatório para com absolutamente todos os outros órgãos vitais, é justo considerarmos nobre tal sistema.

A seguir, faremos uma breve descrição do sistema circulatório, dando atenção especial ao coração e à maneira pela qual este órgão desempenha sua função bombeadora (Guyton, 1988; Blaustein & Walsh, 1993; Hoit & Walsh, 1993, Josephson & Sperelakis, 1993; Walsh, 1993; Berne & Levy, 1996; Opie, 1998).

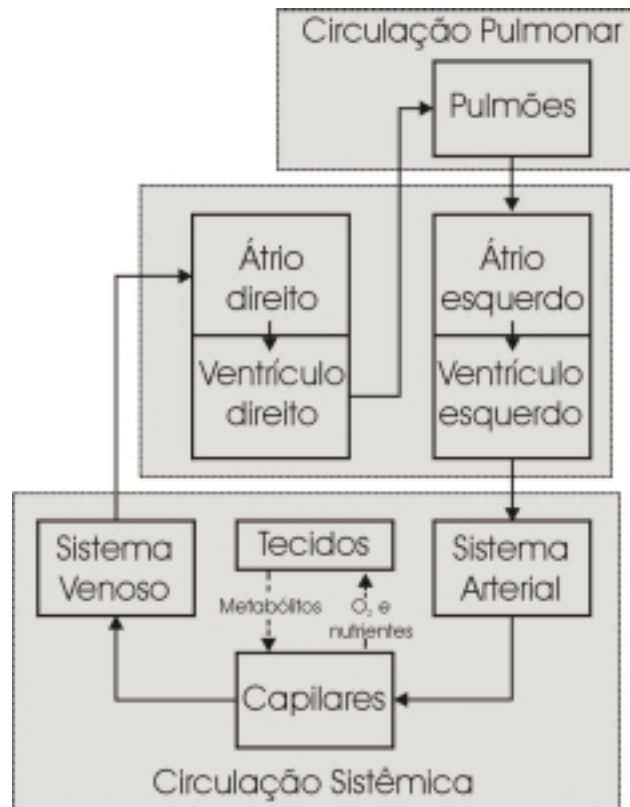
O sistema circulatório tem como funções principais: a) por meio do sangue, levar nutrientes e oxigênio a todas as células do nosso corpo, bem como captar e conduzir os subprodutos do metabolismo celular a seus pontos de eliminação; b) transportar os hormônios dos seus sítios de produção para suas células-alvos; c) transportar anticorpos e células do sistema imune; e) atuar no controle da temperatura corporal, permitindo variação da taxa de perda de calor pelo corpo. Para desempenhar eficientemente tais funções, o sistema circulatório está organizado (sob o ponto de vista dos circuitos formados pelos vasos sanguíneos) como mostrado na **Figura 1.1**.

Como é mostrado na **Figura 1.1**, a circulação, de um modo geral, poderia ser subdividida em 2 circuitos principais: o sistêmico e o pulmonar. A circulação sistêmica compreende os vasos sanguíneos que irrigam todos os tecidos, exceto os alvéolos pulmonares. Estes, que é o local onde ocorre a oxigenação do sangue e eliminação do dióxido de carbono, são irrigados por vasos da circulação pulmonar.

Para que o sangue flua através da árvore circulatória, é necessária a existência de um gradiente de pressão entre o início (saída dos ventrículos) e o final (entrada dos átrios) dos circuitos pulmonar e sistêmico. O coração é classicamente visto como uma bomba mecânica, desempenhando um importante papel na geração deste gradiente de pressão.

O coração é composto predominantemente de tecido muscular (miocárdio), o que permite o desenvolvimento de sua atividade bombeadora. A contração muscular é disparada pela ativação elétrica do tecido por meio do potencial de ação (PA), que é gerado em células automáticas especializadas (marca-passos) e conduzido até as células contráteis das paredes das câmaras cardíacas. O coração é dotado de um complexo sistema de ativação e condução elétrica que permite o estabelecimento de um sincronismo e temporização da

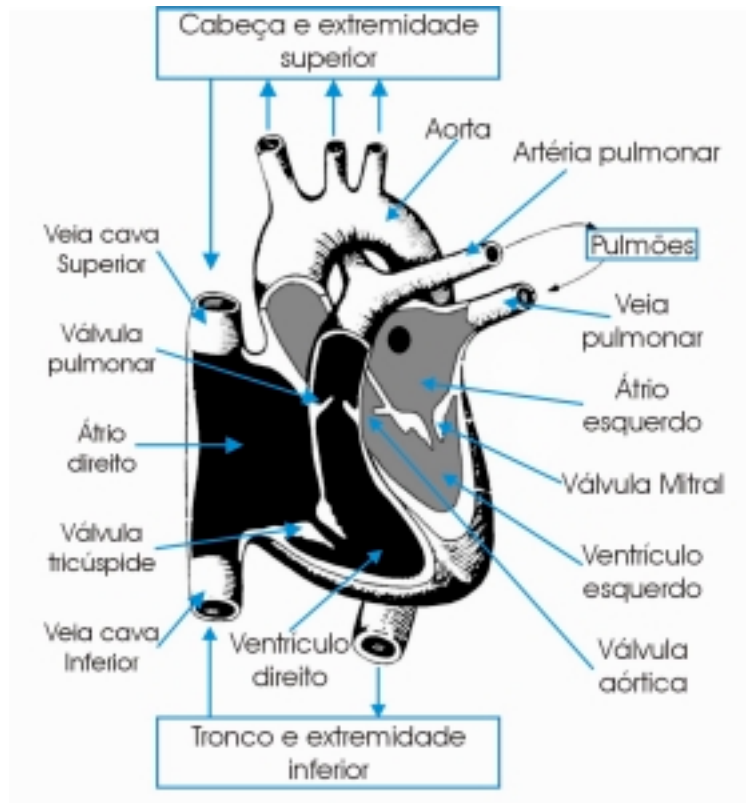
contração das células que compõem suas várias câmaras. Este sincronismo é essencial para que se possa extrair o máximo do coração no desempenho de sua função.



**Figura 1.1** – Organização do sistema circulatório. As setas indicam o sentido do fluxo sanguíneo.

A **Figura 1.2** mostra as diversas estruturas do coração mecanicamente envolvidas com o bombeamento sanguíneo. Os vasos sanguíneos mostrados na figura são classificados como veias (vasos que levam sangue para o coração) ou artéria (vasos que levam sangue do coração). Entre as veias, destacam-se as veias cava superior e inferior, que conduzem ao átrio direito sangue com baixa concentração de oxigênio, e a veia pulmonar, a qual leva ao átrio esquerdo sangue com alta concentração de oxigênio. As principais artérias, como podemos observar na **Figura 1.2**, são a artéria pulmonar, pela qual flui sangue pobre em

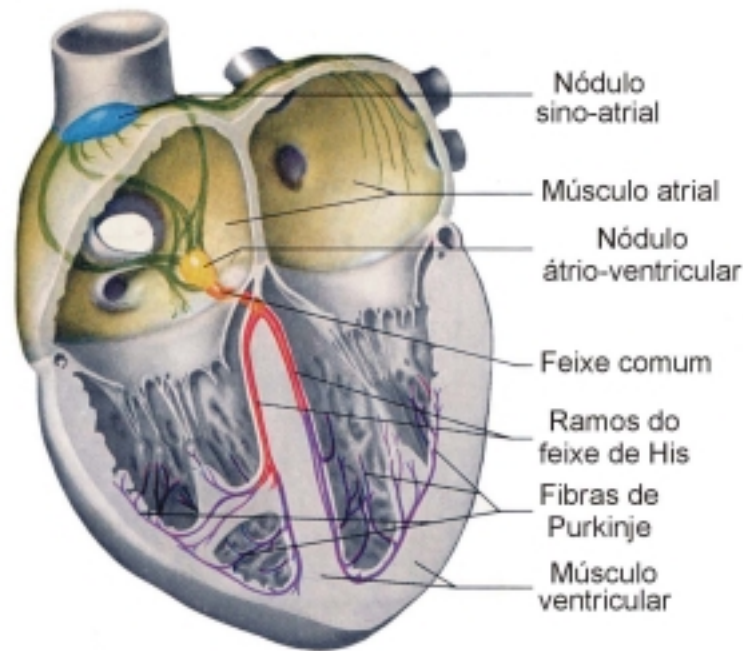
oxigênio do ventrículo direito para os pulmões, e a artéria aorta, a qual leva sangue arterial para a circulação sistêmica.



**Figura 1.2** – Estruturas do coração e vasos anexos (modificado de Guyton, 1988).

As câmaras cardíacas, mostradas na **Figura 1.2**, têm paredes formadas por músculo, que, ao contrair-se, impulsionam o sangue. Aos átrios cabem as funções de armazenar sangue que chega a eles através das veias e transferir este sangue aos ventrículos. Aos ventrículos cabe a função de efetivamente bombear o sangue para a circulação, através do circuito ao qual esteja associado por meio de suas artérias. As válvulas cardíacas possuem a função de separar as câmaras atriais das ventriculares e de retificar o fluxo de sangue através das mesmas, ou seja, determinar o sentido do fluxo sanguíneo, sempre dos átrios para os ventrículos e destes para as artérias.

Na **Figura 1.3** temos uma ilustração das diversas estruturas do coração envolvidas com a geração e propagação da atividade elétrica pelo coração. É importante ter em mente que, estando também envolvido na condução da atividade elétrica, o tecido muscular responsável pela contração do coração é também um elemento do sistema de ativação elétrica.



**Figura 1.3** - Figura ilustrando as estruturas do coração envolvidas na geração e condução da atividade elétrica cardíaca (Modificado de Netter, 1978).

Para entendermos como a atividade elétrica do coração harmoniza-se com a função mecânica do órgão, consideremos um ciclo cardíaco, que descreve um ciclo completo de atividade durante um único batimento cardíaco. Será descrito o ciclo com relação à secção esquerda do coração, por motivo de simplificação. Porém, o ciclo também ocorre na secção direita, embora nesta o regime de pressão seja inferior:

O ciclo cardíaco começa logo após a sístole ventricular (fase de contração dos ventrículos). Neste momento, devido á baixa pressão intraventricular esquerda (pois o miocárdio está relaxado e a câmara contém apenas um pequeno volume de sangue), a válvula atrioventricular (mitral) abre-se, o que permite o enchimento do ventrículo com o

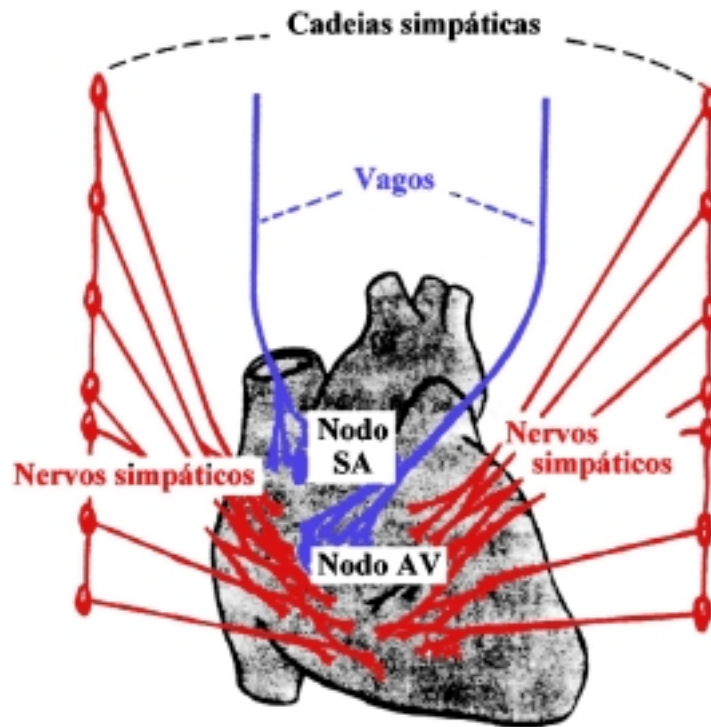
sangue contido no átrio (proveniente das veias pulmonares). A seguir, o nódulo sino-atrial (SA) dá início a uma onda de despolarização que dali se espalha pelos átrios até atingir o nódulo atrioventricular (AV). Por onde passa, esta onda de despolarização dispara a contração muscular. Assim, desenvolve-se a contração da câmara atrial, com ejeção de sangue para o ventrículo. Quando a onda de despolarização chega ao nódulo AV, sua velocidade de propagação é reduzida, o que permite que a sístole atrial ocorra antes da ventricular. Após percorrer o nódulo AV, a onda chega ao sistema de His-Purkinje, o qual rapidamente conduz a ativação elétrica através do septo interventricular e da parede ventricular, de modo que a onda atinge primeiro o ápice, e depois se propaga em direção à base do coração. O aumento da pressão intraventricular causado pela contração ventricular (que é temporalmente associada ao relaxamento atrial) promove o fechamento da válvula mitral e, quando ultrapassa a pressão do segmento inicial da aorta, causa a abertura da válvula aórtica. Deste modo, o sangue é finalmente impulsionado para a circulação sistêmica. A ejeção do sangue causa redução da pressão intraventricular, o que ocasiona fechamento da válvula aórtica, interrompendo a fase de ejeção. Isto coincide com a repolarização e consequente relaxamento do miocárdio, que entra em diástole (fase de "repouso" elétrico e mecânico).

Como todos nós em vários momentos de nossas vidas já tivemos a oportunidade de verificar, a frequência e a intensidade do bombeamento de sangue desenvolvido pelo coração podem mudar a todo instante e por diversos motivos. Essas mudanças estão envolvidas no ajuste do débito cardíaco (definido como o volume de sangue bombeado pelo coração por unidade de tempo), e são sustentadas por dois mecanismos.

O primeiro consiste em uma auto-regulação intrínseca da força de contração do miocárdio em resposta a alterações no volume de sangue que chega ao coração. Por este mecanismo, também chamado de mecanismo de Frank-Starling, quanto maior for a quantidade de sangue que chega ao coração, mais intensa será a contração cardíaca (até um certo limite), implicando em um aumento do volume bombeado e do débito cardíaco. Isto acontece, por exemplo, no exercício, em resposta a mudanças posturais, de temperatura ambiente e do volume de sangue circulante.

O segundo mecanismo consiste no controle nervoso da atividade cardíaca. Por este mecanismo, o sistema nervoso central controla a frequência e a força de contração

desenvolvida pelo coração, principalmente através da liberação de neurotransmissores das terminações nervosas autonômicas simpáticas e parassimpáticas, que inervam o coração. Estas eferências neurais (ilustradas na **Figura 1.4**) fazem parte de complexos sistemas reflexos de regulação das funções cardiovascular e respiratória, e do balanço hidro-salino.



**Figura 1.4** – Esboço ilustrando as eferências simpática e parassimpática do coração (modificado de Guyton, 1998).

Como podemos observar na **Figura 1.4**, os dois átrios são especialmente bem supridos com grande número tanto de terminações simpáticas quanto parassimpáticas, mas os ventrículos são supridos principalmente por nervos simpáticos.

As terminações vagais (parassimpáticas) utilizam como neurotransmissor a acetilcolina (ACh), que atua no nódulo SA, deprimindo seu automatismo e levando à redução de sua frequência espontânea de despolarização (efeito cronotrópico negativo). A ACh atua também no nódulo AV reduzindo a velocidade de condução da atividade elétrica. A ACh parece também deprimir a força de contração em tecido atrial, mas este efeito não é

claro no miocárdio ventricular (Opie, 1998; Endoh, 1999). Para que a ACh possa ter algum efeito sobre um determinado tecido, é necessário que este tecido possua receptores para o neurotransmissor. O tipo de receptor para ACh encontrado em todo o coração é o receptor colinérgico muscarínico do tipo  $m_2$  (Opie, 1998). É importante observar que estes receptores não se encontram uniformemente espalhados pelo coração, mas sua densidade é maior nas regiões próximas às terminações nervosas parassimpáticas (Löffelholz & Pappano, 1985). Esta característica na distribuição espacial dos receptores  $m_2$  poderia explicar o efeito da ACh sobre a dispersão da refratariedade que, como exposto mais adiante, pode estar envolvido com a geração de arritmias atriais.

As terminações simpáticas liberam como neurotransmissor a noradrenalina (NA) que, além de afetar o automatismo e a velocidade de propagação elétrica do modo oposto ao da ACh, também tem efeito inotrópico positivo, isto é, aumenta a força de contração atrial e ventricular (Opie, 1998). Quanto aos receptores para NA, no coração destaca-se o tipo  $\beta$ , presentes na membrana de células dos nódulos SA e AV, e células miocárdicas atriais e ventriculares (Opie, 1998).

Um parâmetro importantíssimo que é fundamental para a manutenção do padrão de condução da atividade elétrica é a refratariedade do miocárdio. Associado ao PA, o período refratário consiste no mínimo intervalo de tempo entre o instante em que uma célula é ativada por uma onda de despolarização e o momento em que esta célula pode ser novamente ativada. Observe que esta característica retifica o sentido da propagação da atividade elétrica pelo miocárdio, pois a mesma célula não pode ser re-excitada por propagação retrógrada da atividade elétrica (a menos que este se propague em círculo, como veremos adiante). A duração do período refratário guarda relação estreita com a duração do PA. Deve-se ressaltar que neurotransmissores que afetam a duração do PA têm profunda influência sobre o período refratário. Por exemplo, foi mostrado que a ACh reduz o período refratário atrial (Hoffman & Suckling, 1953; Boucher *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Como já foi dito, os receptores muscarínicos, bem como as terminações parassimpáticas, não estão uniformemente espalhadas pelo átrio. Deste modo, quando as terminações parassimpáticas liberam ACh, o tecido atrial não teria sua refratariedade modificada de maneira uniforme, o que pode dar origem à chamada dispersão da



refratariedade. Este fenômeno tem sido implicado no efeito arritmogênico da ACh (Allessie *et al*, 1984; Euler & Scanlon, 1987; Godoy *et al*, 1999; Mandapati *et al*, 1999).

Assim, a função do sistema de geração e condução da ativação elétrica cardíaca é estabelecer a temporização do funcionamento das várias câmaras contráteis do coração. Esta temporização é conseguida pelo estabelecimento e manutenção de um padrão de propagação da onda de despolarização. Portanto, este padrão dita a dinâmica temporal da contração cardíaca. Perturbações da frequência e/ou do padrão de ativação/propagação da atividade elétrica são fenômenos denominados de arritmias cardíacas.

## **1.1 ARRITMIAS ATRIAIS**

Os principais distúrbios da propagação da atividade elétrica são os bloqueios da condução e os circuitos reentrantes. Os distúrbios da geração da atividade elétrica podem ter origem no nódulo SA ou em focos ectópicos, que podem ainda ter localização diversa.

Relativamente ao local de ocorrência das arritmias, podemos classificá-las como supraventriculares (ou atriais) e paraventriculares (ou ventriculares). As arritmias podem ainda ser classificadas com relação à frequência de ativação cardíaca: por exemplo, denomina-se taquiarritmias as arritmias que levam a um aumento na frequência de ativação elétrica cardíaca. Neste trabalho estudamos taquiarritmias atriais, ou seja, distúrbios elétricos que ocorrem no átrio e levam a um aumento da frequência de ativação elétrica deste tecido.

Contrariamente às taquiarritmias ventriculares, as taquiarritmias atriais possuem baixo potencial de letalidade, mas podem comprometer seriamente a função circulatória, pois tais taquiarritmias reduzem a eficiência funcional dos átrios e prejudicam a condução da ativação elétrica para os ventrículos numa frequência e ritmo adequados. Como resultado da permanência do sangue por algum tempo no átrio sem ser bombeado para o ventrículo, podem ser gerados pequenos coágulos que, depois conduzidos pela circulação sistêmica e pulmonar, podem obstruir vasos de pequeno calibre. Isto é denominado tromboembolismo, e pode levar ao desenvolvimento de acidente vascular cerebral (derrame cerebral), edema pulmonar, e infarto do miocárdio (Lin *et al*, 1996; Seidl *et al*, 1998;

Minamino *et al*, 1999). Para se ter uma idéia da gravidade do problema, foi observado que 25 % de vítimas de acidentes vasculares cerebrais apresentaram episódios prévios de taquiarritmia atrial (Prystowsky *et al*, 1996).

O índice de prevalência de taquiarritmias atriais apresenta um aumento substancial após os 50 anos de vida: este índice é 0,5% para idades entre 50 e 59 anos e chega a 9% para idades entre 80 e 89 anos. A prevalência é sempre mais alta em homens do que em mulheres (Kannel *et al*, 1998). O alto índice de prevalência de taquiarritmias atriais é um indicador de seu alto grau de recorrência, e as taquiarritmias atriais são consideradas a forma mais comum de arritmia cardíaca crônica (Kannel *et al*, 1998; Seidl *et al*, 1998). Levando-se em conta a previsão de aumento considerável da proporção de idosos, torna-se claro que a importância clínica das taquiarritmias atriais tende a crescer de modo marcante.

## **1.2 MECANISMOS PROPOSTOS PARA GERAÇÃO E MANUTENÇÃO DE TAQUIARRITMIAS ATRIAIS**

Diversos investigadores têm proposto que a ocorrência de taquiarritmia atrial esteja associada a um dos fenômenos descritos a seguir:

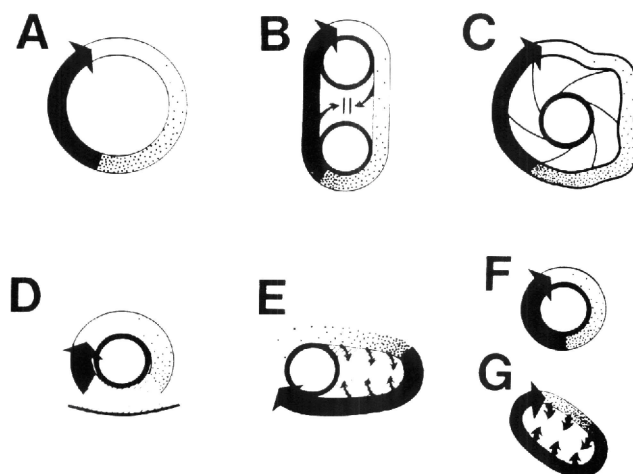
### **1.2.1 Desenvolvimento de focos ectópicos de atividade espontânea**

Como o próprio nome sugere, estes focos ectópicos consistem de grupos celulares, distribuídos pela massa muscular atrial, que passam a apresentar uma atividade marca-passo, com frequência relativamente estável, o que leva o átrio a apresentar um padrão anormal de ativação elétrica. Os focos ectópicos podem ser ocasionados por aumento da automaticidade de células marca-passo latentes ou do sistema de condução, ou ocorrência de automatismo disparado pela própria ativação elétrica (*triggered automaticity*) em células miocárdicas, como no caso das pós-despolarizações (*afterdepolarizations*). O aumento da automaticidade em células que normalmente possuem despolarização diastólica espontânea pode ser ocasionado por estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Roden, 1996). Já a ocorrência de automatismo disparado por ativação elétrica, também verificada em células musculares,

pode ser causada por sobrecarga intracelular de cálcio e por aumento na duração do potencial de ação celular, (Roden, 1996).

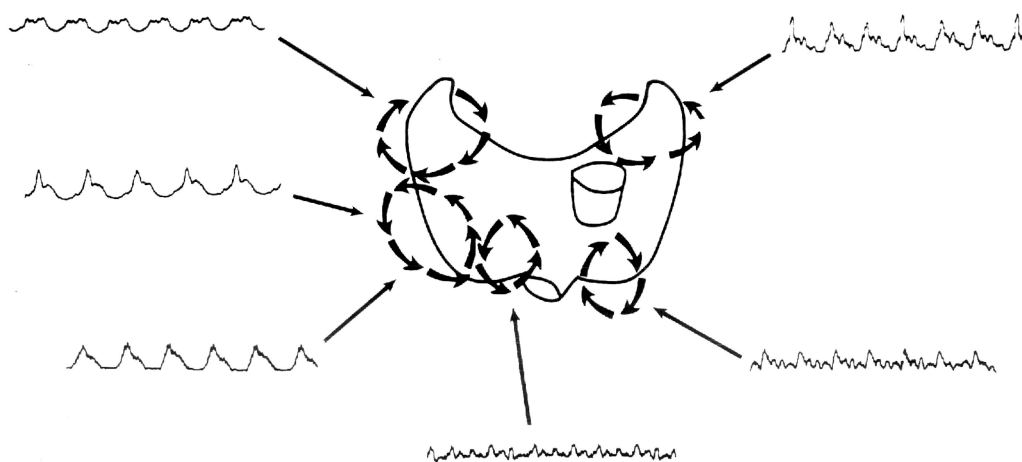
### 1.2.2 Desenvolvimento de circuitos reentrantes (flutter e fibrilação)

Os circuitos reentrantes são ondas de despolarização com a capacidade de auto-regeneração. Os circuitos reentrantes definem, assim, regiões no tecido atrial cuja ativação elétrica é independente do nódulo SA, e que podem ser estáticas ou não (Vaidya *et al*, 1999). A **Figura 1.5** mostra esquemas de possíveis padrões circulares de ativação elétrica (circuitos reentrantes) no átrio.



**Figura 1.5** – Representação esquemática dos vários possíveis tipos de padrões circulares de ativação no átrio. As setas representam a crista de uma onda de despolarização circulante e, em sua cauda, estaria a área em fase de período refratário absoluto. A área hachurada indica a parte de tecido em período refratário relativo. **(A)**: primeiro modelo proposto para ilustrar a forma de um circuito reentrante; **(B)**: movimento circular ao redor da inserção de duas veias; **(C)**: modelo de movimento circular no qual a atividade elétrica circula em uma estrutura composta de um feixe de fibra muscular atrial dotada de alta velocidade de condução, dentro do qual a atividade elétrica dá voltas; **(D)** e **(E)**: tipos de movimentos circulares baseados na combinação de um obstáculo anatômico ao lado de uma área atrial doente exibindo baixa velocidade de condução (área hachurada); **(F)**: movimento circular ao redor de um obstáculo relativamente pequeno, possivelmente causado por alterações no período refratário e na velocidade de condução da atividade elétrica; **(G)**: movimento circular sem o envolvimento de qualquer obstáculo anatômico (modificado de Allesie *et al*, 1984).

Propõe-se que a geração de circuitos reentrantes estaria associada à: **a)** ocorrência de focos ectópicos (Hoffman & Rosen, 1981); **b)** ao desenvolvimento de barreiras físicas que retardam ou bloqueiam a propagação da onda de despolarização, como, por exemplo, tecido cicatricial (Hoffman & Rosen, 1981); **c)** à diminuição do período refratário (Godoy *et al.*, 1999; Hoffman & Rosen, 1981; Euler *et al.*, 1996); **d)** à diminuição da velocidade de condução atrial (Hoffman & Rosen, 1981, Rohr *et al.*, 1998). Em um mesmo átrio poderiam se desenvolver vários circuitos reentrantes, como mostra a **Figura 1.6**.



**Figura 1.6** – Representação de um átrio direito de cão, com ocorrência simultânea de seis circuitos reentrantes. Estão apresentados os sinais eletrográficos registrados *in vivo* em cada região (modificado de Allesie *et al.*, 1984).

### 1.3 ESCOPO DO PRESENTE TRABALHO

O presente trabalho dá continuidade ao estudo da indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência, utilizando o modelo experimental *in vitro* proposto por Godoy *et al.* (1999), com átrio direito isolado de rato. Entre as vantagens deste modelo, além do baixo custo do animal (comparado com cão, por exemplo), encontra-se a possibilidade de realizar testes farmacológicos com maior facilidade e eficiência do que modelos *in vivo*. Isto se deve à maior possibilidade de controle da concentração administrada de fármacos, bem como de outros fatores físicos e químicos do ambiente.

Estudos recentes (Allessie *et al*, 1984; Euler & Scanlon, 1987; Godoy *et al*, 1999; Mandapati *et al*, 1999) apresentaram evidência de que a ACh pode levar ao desenvolvimento e manutenção de taquiarritmias atriais em preparações isoladas e *in vivo*. Godoy *et al*. (1999) demonstraram que o desenvolvimento de taquiarritmia atrial induzida por estimulação elétrica requer a ocupação de receptores colinérgicos muscarínicos, e propuseram que a indução de taquiarritmia neste modelo experimental seja facilitada pela liberação de ACh endógena das terminações parassimpáticas atriais, promovida pela estimulação elétrica. No entanto, há poucos relatos na literatura que permitam o estabelecimento de um quadro mais claro dos mecanismos celulares subjacentes à influência arritmogênica de agonistas colinérgicos. Neste trabalho, procuramos verificar alguns mecanismos relacionados ao efeito destes agonistas no tecido atrial, buscando contribuir para a elucidação desta questão, e testamos o efeito de alguns agentes farmacológicos comumente utilizados para o tratamento clínico de taquiarritmias atriais.

Como exposto anteriormente, ACh e NA apresentam um claro antagonismo funcional (i.e., produzem efeitos opostos) no coração. Como ambos são neurotransmissores liberados tonicamente e com taxas variáveis no tecido cardíaco, buscamos também neste trabalho analisar os efeitos da ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos sobre a ocorrência de taquiarritmia por estimulação elétrica de alta frequência. Procuramos ainda, com o uso de ferramentas farmacológicas, identificar mecanismos celulares importantes na determinação da vulnerabilidade do tecido a taquiarritmias atriais.

Por fim, este trabalho teve como objetivo adicional reestruturar a montagem experimental originalmente proposta por Godoy *et al*. (1999), como, por exemplo, pela introdução da estimulação por campo elétrico (*vs.* eletrodos perfurantes, vide Capítulos 2 e 3). Neste aspecto metodológico, procuramos ainda caracterizar a influência dos parâmetros estimulatórios e desenvolver protocolos com diferentes graus de efetividade na indução de taquiarritmia neste modelo experimental.

## **Capítulo 2**

### Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi aprofundar a caracterização do modelo de indução de taquiarritmia atrial desenvolvido por Godoy *et al.* (1999), tanto no aspecto metodológico, quanto no aspecto mecanístico a nível celular.

Os objetivos específicos foram:

- a) Desenvolver uma montagem experimental alternativa, na qual o tecido é estimulado por campo elétrico;
- b) Desenvolver e testar protocolos de estimulação elétrica para indução de taquiarritmia em átrio isolado de rato; e
- c) Estudar a influência de agentes farmacológicos sobre a ocorrência de taquiarritmia por estimulação elétrica, buscando maior entendimento dos mecanismos celulares envolvidos.

# **Capítulo 3**

## **Material e Métodos**



### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar adultos de ambos os sexos (5 a 7 meses de idade), provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos até o dia do experimento no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) /UNICAMP (biotério registrado pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal - COBEA, no. 35). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas plásticas (3 animais por gaiola), com cama de maravalha esterilizada, trocada 3 vezes por semana, e mantidos sob regime de iluminação de 12 h claro: 12 h escuro. Água filtrada e ração balanceada peletizada (Nuvital) foram oferecidos em regime *ad libitum*. Suplementação multivitamínica líquida (Vitagold) foi administrada com periodicidade quinzenal. Os animais não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de sua utilização.

O protocolo experimental utilizado neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP (certificado No. 181-1).

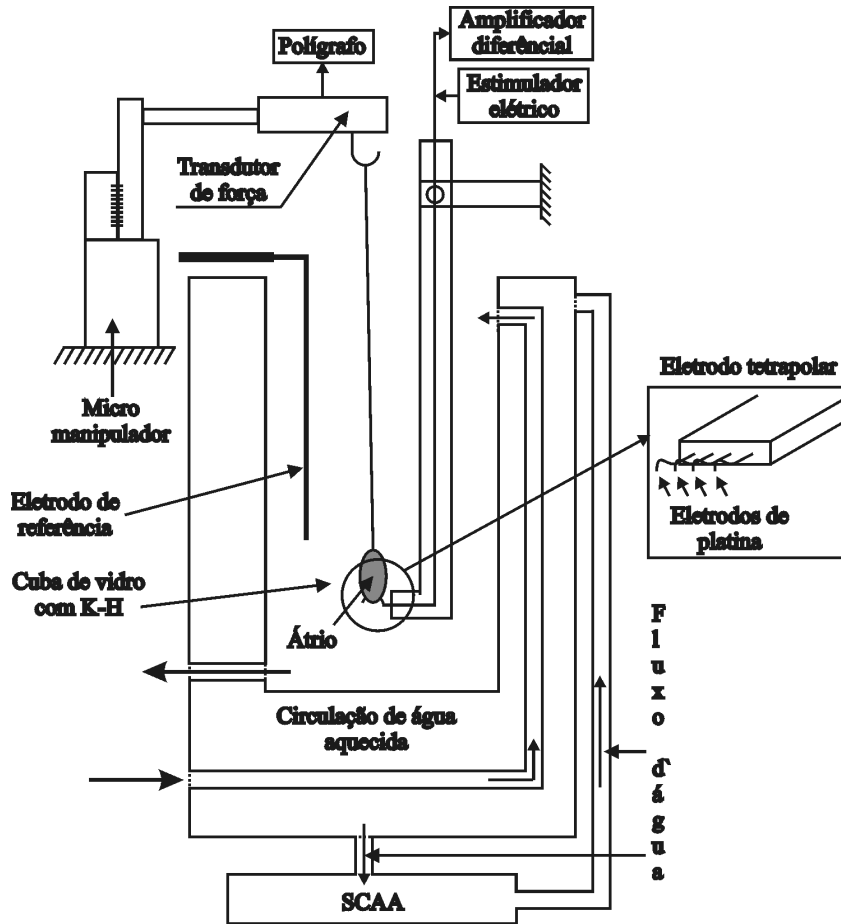
### **3.2 PREPARAÇÃO BIOLÓGICA**

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral seguida de exsanguinação por secção dos vasos sangüíneos cervicais. Após o sacrifício do animal, a caixa torácica e o pericárdio foram abertos, e o coração foi retirado. O coração foi mergulhado em solução de Krebs-Henseleit modificada (K-H) oxigenada por alguns minutos, para retirada do excesso de sangue. A seguir, procedeu-se à dissecação do átrio direito (AD), que foi montado no sistema descrito no item 3.3, sob estiramento com 0,5 gf. A preparação foi mantida a  $36,5 \pm 0,5$  °C, sob borbulhamento com carbogênio (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) durante todo o experimento.

### 3.3

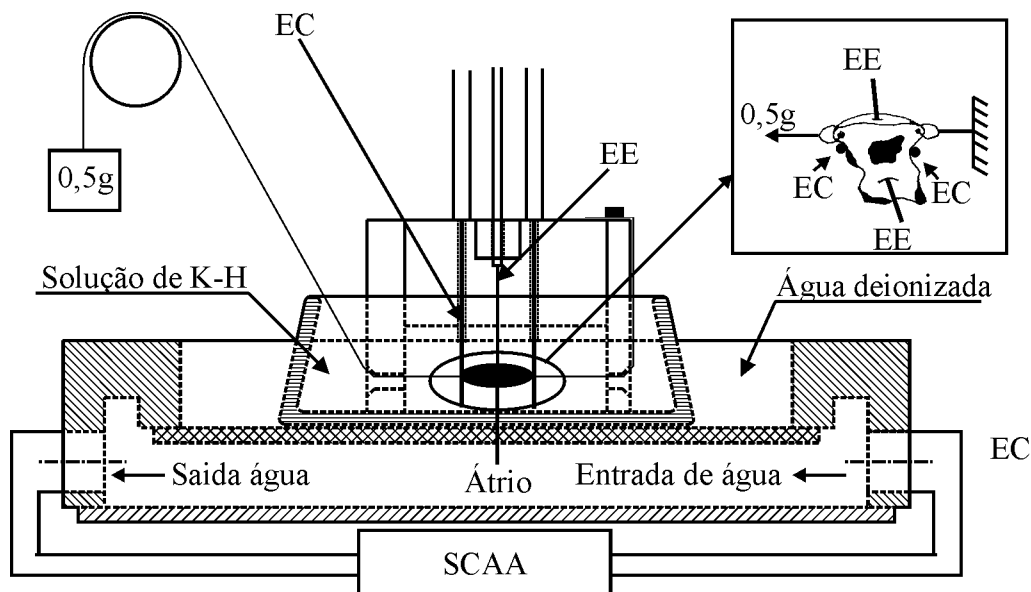
### MONTAGEM EXPERIMENTAL

Inicialmente, foi utilizado um sistema de montagem vertical do AD (Godoy *et al.*, 1999), mostrado na **Figura 3.1**. Posteriormente, foi desenvolvido um sistema para montagem horizontal do átrio, apresentado na **Figura 3.2**.



**Figura 3.1** Esquema ilustrativo do sistema de montagem vertical do AD. Neste sistema, o átrio é empalado por um eletrodo tetrapolar e preso a um transdutor de força. Dois dos eletrodos do sistema tetrapolar são usados para estimulação, portanto conectados a um estimulador elétrico; os outros dois são usados para captação do eletrograma e são conectados a um amplificador diferencial. O átrio é mantido em solução de K-H constantemente borbulhada com carbogênio. A câmara que contém o átrio é envolvida por um compartimento onde circula água aquecida, o que torna possível manter sua temperatura em um valor desejado. A água aquecida é mantida em circulação por um sistema de circulação e aquecimento de água (SCAA). As câmaras interna e externa são constituídas de vidro temperado (Modificado de Godoy, 1990).

Em ambos os sistemas, o átrio é mantido em um compartimento contendo solução de K-H constantemente borbulhada com carbogênio. Este compartimento é envolvido por outro compartimento, no qual é mantido um fluxo constante de água aquecida por um sistema de circulação e aquecimento de água (SCAA). Isto permite a manutenção da temperatura no compartimento que contém a preparação biológica.



**Figura 3.2** – Esquema ilustrativo do sistema de montagem horizontal do AD. Neste sistema o átrio é preso horizontalmente por dois fios de algodão, um fixo e outro amarrado a uma carga de 0,5 g. Como podemos observar no *inset* da figura, o par de eletrodos de estimulação (EE) é colocado em posição aproximadamente ortogonal com relação ao par de eletrodos de captação do eletrograma (EC). O átrio é mantido em solução de K-H constantemente borbulhada com carbogênio. A câmara onde fica o AD é envolvida por um compartimento onde é bombeada água aquecida por um sistema de circulação e aquecimento de água (SCAA), o que torna possível manter sua temperatura em um valor desejado. A câmara foi feita de vidro, com exceção da parede lateral da câmara externa, que foi feita de acrílico.

Em ambas as montagens, foi utilizado um par de eletrodos para captação do eletrograma atrial e um par de eletrodos para estimulação elétrica do átrio. No sistema vertical, isto foi feito por meio de um eletrodo de platina tetrapolar que empalava a extremidade inferior do átrio. A outra extremidade foi presa, por meio de um gancho de aço

inoxidável, a um transdutor isométrico de tensão (Narco Biosystems, mod F60), de modo que era possível o registro da força de contração desenvolvida, além do eletrograma. Já no sistema horizontal, o átrio não era empalado e os eletrodos eram externos, com possibilidade de ajuste de sua posição para melhor captação do sinal elétrico e/ou estimulação. Esta flexibilidade do sistema horizontal permite dispor os eletrodos de captação perpendicularmente aos eletrodos de estimulação, o que reduz a captação de artefatos de estímulo. Nesta montagem, o átrio era fixado a um suporte e preso a uma massa de 0,5 g por meio de um fio de algodão. Esta foi a montagem utilizada para obtenção dos resultados experimentais descritos neste trabalho, exceto quando indicado.

### **3.3.1 Registro do eletrograma atrial**

Na **Figura 3.3**, está apresentado um diagrama dos sistemas para captação do eletrograma atrial e estimulação elétrica.

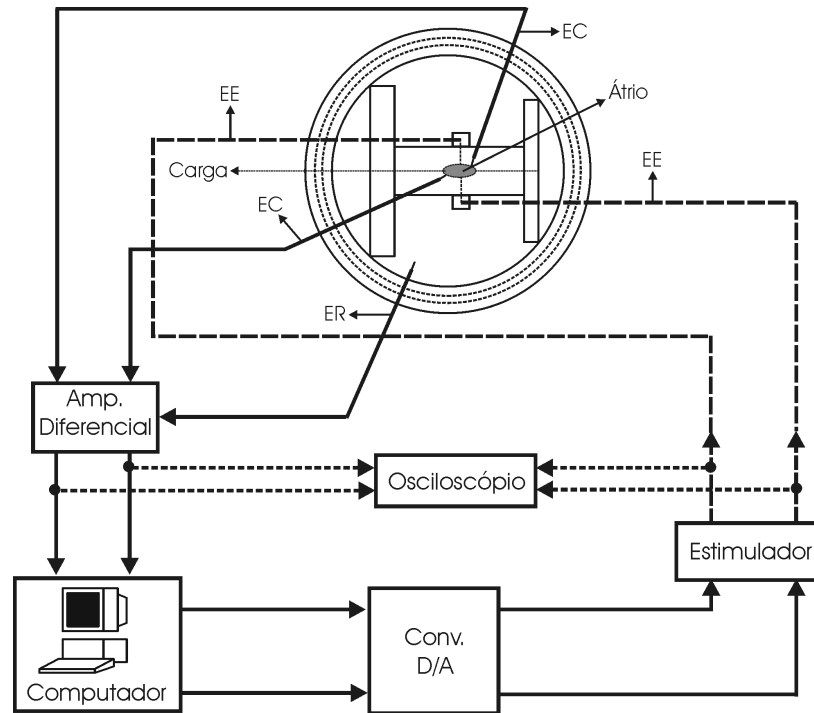
Para registrar o eletrograma atrial, foram utilizados 3 eletrodos de prata cloretada: dois de registro e um de referência. O último foi imerso na solução da câmara, afastado da preparação biológica. Estes eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial com filtro *notch* (projeto CEB/UNICAMP n° 98-5514), utilizando um acoplador universal (Narco Biosystems mod. 7189; ou World Precision Instruments, mod. DAM 5A), cuja saída foi ligada a: a) uma placa de aquisição de dados (Lynx CAD1236), conectada a um computador (Ciryx DX2, 66MHz), para registro e armazenamento do eletrograma; e b) a um osciloscópio (Tektronix TDS210), para monitoração contínua do sinal.

Para filtragem do sinal do eletrograma atrial, utilizou-se filtros passa-baixas com frequências de corte de 100Hz ou 300Hz, dependendo da qualidade do sinal.

### **3.3.2 Estimulação elétrica atrial**

No sistema de montagem horizontal, o átrio foi estimulado eletricamente através de dois eletrodos de platina, mantidos em contato direto ou próximos da superfície atrial. A disposição dos eletrodos é mostrada na **Figura 3-2**. Utilizou-se trens de pulsos estimulatórios quadrados e bipolares (vide item 3.4). Foi usado um estimulador elétrico de tensão (Narco Biosystems, mod. ST-10) comandado por sistema de estimulação elétrica

(T/UNICAMP G548s) integrado a um computador pessoal (UPDATING mod. BT3002). Este sistema permite controle da amplitude e dos parâmetros temporais da estimulação, e foi desenvolvido no Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP (Godoy, 1990).



**Figura 3.3** – Diagrama representativo do sistema para captação do eletrograma atrial e estimulação elétrica na montagem horizontal. Na figura, os eletrodos de captação (EC) foram conectados a um amplificador diferencial que, por sua vez, era conectado a um computador. No computador, o sinal era adquirido por meio de uma placa de aquisição, e armazenado para posterior análise. O mesmo computador foi ainda usado para comandar o processo estimulatório, por meio de uma placa de geração de sinais digitais, os quais, após conversão digital-analógica, eram usados para comandar um estimulador elétrico de tensão. O estímulo elétrico foi aplicado ao átrio por meio de dois eletrodos de estimulação (EE) de platina. O osciloscópio mostrado na figura foi utilizado para monitoramento contínuo do sinal estimulatório e do eletrograma atrial.

### 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE MONTAGEM DO ÁTRIO DIREITO

Este protocolo básico foi utilizado em todas as preparações, e consistiu de passos que seguiram à montagem da preparação atrial até o momento de início do período de estabilização da mesma.

Estes passos foram:

- a) Fixou-se a amplitude dos pulsos estimulatórios em 2,1V;
- b) Com trens estimulatório curtos (5 - 20 pulsos), determinou-se a melhor disposição espacial dos eletrodos de estimulação, visando a indução de taquiarritmia atrial;
- c) Determinou-se o limiar estimulatório atrial (LE), isto é, a menor amplitude do estímulo capaz de induzir *reset* do nódulo sinoatrial;
- d) Nova tentativa de indução de taquiarritmia (controle manual da estimulação). Em caso de sucesso, fixou-se a amplitude do pulso estimulatório em 2 x LE e dava-se início ao período de estabilização. Não sendo possível induzir taquiarritmia, a amplitude do pulso estimulatório era aumentada progressivamente até que fosse obtido sucesso na indução. Determinou-se, então, o limiar de indução de taquiarritmia (LI), isto é, a menor amplitude do estímulo capaz de induzir taquiarritmia atrial. Neste caso, a amplitude do pulso estimulatório foi fixada em 1,2 x LI e dava-se início ao período de estabilização.

Durante o período de estabilização, os átrios permaneceram contraindo-se espontaneamente por 30 min, sem aplicação de estimulação elétrica. Ao final deste período, era registrada a frequência espontânea inicial, e dava-se início aos experimentos específicos de indução de taquiarritmia, de acordo com protocolos específicos descritos a seguir, neste capítulo.

## 3.5 INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA ATRIAL POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

### 3.5.1 Definições

A) ESTÍMULO: O estímulo unitário utilizado foi um pulso de tensão quadrado, bipolar, simétrico, com duração total de 1 ms (i.e., 0.5 ms em cada polaridade), e amplitude igual ao nível de tensão do pulso, como mostrado na **Figura 3.4a**. A amplitude utilizada em cada preparação foi de 2 x LE ou 1,2 x LI, como explicado no item 3.4.

B) TREM DE PULSOS: É o conjunto de estímulos aplicados de acordo com um padrão temporal definido. Neste trabalho foram utilizados 2 padrões de trens de pulsos estimulatórios:

i) *Trem Simples*: Neste padrão, aplicou-se um número  $n$  de pulsos separados por um intervalo regular de  $i$  milissegundos (vide **Figura 3.4b**), neste caso, considerando-se que a duração total de cada pulso é de 1 ms, a frequência de pulsos do trem ( $f$ ), em Hz, pode ser descrita por:

$$f = 1 / [(1 + i) \cdot 10^{-3}]$$

Como será visto a seguir (item 3.4.2), utilizou-se neste trabalho diferentes protocolos estimulatórios baseados em trens simples, com diferentes valores de  $n$  ou  $i$ .

ii) *Trem Triplo*: Quando esta configuração foi utilizada, o padrão de aplicação dos pulsos foi de 3 blocos sucessivos, com 20 pulsos cada e intervalo inter-pulso de 14,5 ms, separados por pausas de 1,3 s (vide **Figura 3.4c**). É importante ressaltar que, em trens triplos, o número de pulsos, o intervalo entre pulsos e a duração da pausa foram invariáveis.

C) TENTATIVA: Definimos como tentativa a aplicação de um trem de pulsos de uma configuração qualquer (isto é, simples, com um dado  $n$  e um dado valor de  $i$ , ou triplo, com

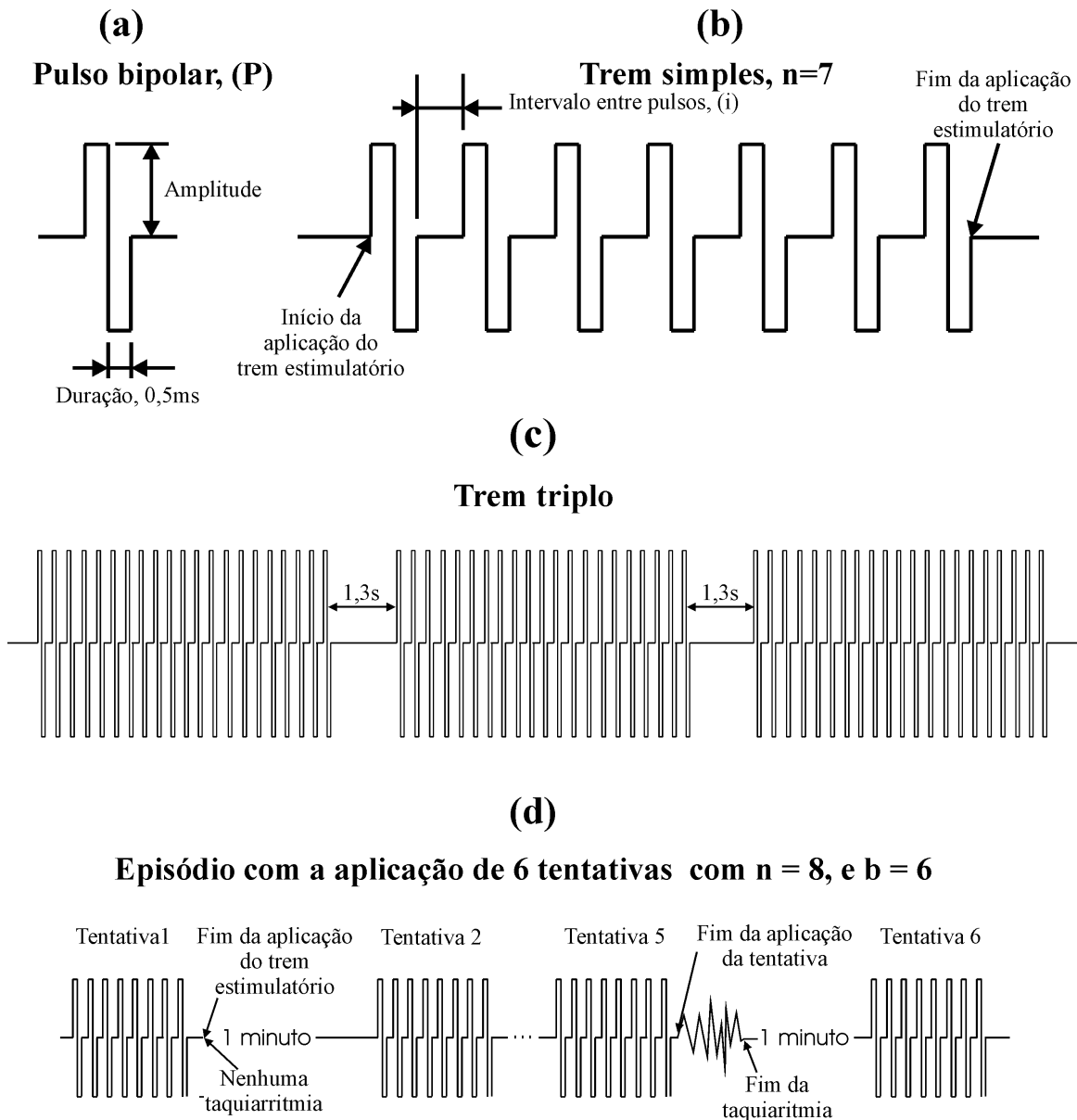
o padrão temporal descrito no parágrafo anterior), com objetivo de induzir taquiarritmia no tecido atrial. O critério utilizado para identificar a ocorrência de taquiarritmia foi a presença, após o término do trem de pulsos, de atividade elétrica atrial espontânea de frequência mínima de 10 Hz (i.e., maior ou igual ao triplo da frequência espontânea atrial média antes da tentativa) e duração mínima de 0,2 s. Registros originais de eletrogramas mostrando sucesso e insucesso na indução de taquiarritmia estão mostrados no Capítulo 4.

D) EPISÓDIO: Cada episódio era composto de 6 a 10 tentativas, utilizando trens de pulso com a mesma configuração (**Figura 3.4D**). Num episódio, tentativas sucessivas foram separadas por um período de 1 min. Caso uma dada tentativa evocasse taquiarritmia, a próxima tentativa era iniciada 1 min após o término da taquiarritmia. Caso a arritmia não cessasse espontaneamente num período de 15 s, estimulava-se a preparação com pulsos de apresentação aleatória para revertê-la, após o que se aguardava um período de 1 min antes da próxima tentativa. O índice de inducibilidade de taquiarritmia (IT) em cada episódio foi considerado como a fração das tentativas do episódio em que taquiarritmia foi induzida. Por exemplo,  $IT = 0,40$  quando, num episódio composto de 10 tentativas, 4 delas induziram taquiarritmia. Quando mais de um episódio era aplicado a uma preparação, observava-se um período mínimo de descanso entre episódios de 15 min, para permitir estabilização da frequência atrial.

### **3.5.2 Influência dos parâmetros estimulatórios sobre a indução de taquiarritmia atrial**

Com esta série de experimentos tivemos como objetivo de investigar se a inducibilidade de taquiarritmia por estimulação elétrica apresentava dependência de parâmetros estimulatórios, como frequência e número de pulsos do trem simples de estímulos.





**Figura 3.4** – (a) representação de um estímulo unitário, ou seja, um pulso bipolar de tensão (P) utilizado para estimulação atrial; (b) representação de um trem simples composto de 7 pulsos ( $n = 7$ ), separados por um intervalo de  $i$  ms; (c) representação de um trem triplo de pulsos, como o utilizado neste trabalho para indução de taquiarritmia; (d) representação de um episódio com 6 tentativas ( $b = 6$ ), cada tentativa consistindo de um trem com 8 pulsos ( $n=8$ ). Observe no eletrograma estilizado, ocorrência de taquiarritmia após a 5ª tentativa.

### 3.5.2.1 Número de pulsos por trem estimulatório

Neste experimento, aplicou-se ao átrio 5 episódios estimulatórios sucessivos, cada um composto de 10 tentativas iguais. Em todos eles, a frequência do trem foi constante, de

66,7 Hz (Godoy *et al.*, 1999). Em cada episódio, o número de pulsos do trem foi fixado em 50, 100, 150, 200 ou 250. Para minimizar um possível efeito do tempo sobre a inducibilidade de arritmia, em algumas preparações aplicou-se episódios sucessivos nos quais a ordem do número de pulsos era crescente (i.e., *episódio 1*: 10 tentativas com 50 pulsos/trem; *episódio 2*: 10 tentativas com 100 pulsos por trem;...; *episódio 5*: 10 tentativas com 250 pulsos/trem), enquanto que em outras preparações, a ordem de apresentação foi decrescente (i.e., *episódio 1*: 10 tentativas com 250 pulsos/trem;...; *episódio 5*: 10 tentativas com 50 pulsos/trem).

### **3.5.2.2 Freqüência do trem estimulatório**

Neste protocolo, ao contrário daquele descrito no item 3.5.2.1, o número de pulsos em cada trem simples foi constante (250 pulsos), com variação da freqüência dos trens aplicados em cada episódio. Neste caso, cada episódio foi composto de 8 tentativas iguais. No total aplicou-se 3 episódios, cada um com freqüência do trem de pulsos de 15, 30 ou 66,7 Hz. A ordem de aplicação dos episódios obedeceu a uma seqüência aleatória.

### **3.5.2.3 Teste do protocolo de trens triplos de pulsos**

Nos dois itens anteriores, foram descritos experimentos com variação dos parâmetros estimulatórios de trens simples. Neste trabalho, tentamos também desenvolver um protocolo alternativo que fosse mais efetivo na indução de arritmias. Destes experimentos preliminares com configurações não convencionais de trens de pulsos, escolhemos o trem triplo. Nesta série de experimentos para teste deste protocolo, as preparações foram estimuladas com 3 episódios, cada um com 10 tentativas do mesmo protocolo estimulatório. Em um dos episódios, utilizou-se trens simples de 50 pulsos a 30 Hz, no outro, trens simples de 250 pulsos a 66,7 Hz, e na terceira, o trem triplo (descrito no item 3.5.1). A ordem de aplicação dos episódios obedeceu a uma seqüência aleatória.

### **3.5.3 Influência de fármacos sobre a indução de taquiarritmia**

Nesta série de experimentos, utilizou-se um ou mais dos seguintes protocolos estimulatórios: a) trem simples de 250 pulsos a 66,7 Hz; b) trens simples de 50 pulsos a 30 Hz; e/ou c) trem triplo, como descrito no item 3.5.1. Em todos os casos, um ou mais

episódios (com 6-10 tentativas cada) eram aplicados em condição controle (i.e., antes da adição do fármaco). No caso de mais de um episódio controle, em cada episódio foi utilizado um protocolo estimulatório diferente, para melhor avaliação da inducibilidade de taquiarritmia em preparações individuais. A seguir, o fármaco era adicionado e, após o período de estabilização adequado, corria-se episódio(s) com o(s) mesmo(s) protocolo(s) estimulatório(s) utilizado(s) em condição controle. Os mesmos episódios eram aplicados após a lavagem do fármaco. Portanto, é importante ressaltar que, independentemente do(s) protocolo(s) estimulatório(s) usado(s), ele(s) era(m) sempre o(s) mesmo(s) para determinação de IT na ausência e na presença do fármaco.

A seguir, são descritos os detalhes metodológicos dos experimentos envolvendo o uso de cada fármaco. Algumas vezes, diferentes fármacos foram combinados num mesmo experimento. Neste caso, maiores informações sobre os protocolos farmacológicos podem ser encontradas na secção de **Resultados** (Capítulo 4).

### **3.5.3.1 Efeitos da Carbamilcolina (ou carbacol, CCh)**

O CCh, assim como o neurotransmissor para-simpático acetilcolina (ACh), é um agonista de receptores colinérgicos muscarínicos. No entanto, diferentemente da ACh, o CCh não é sujeito a degradação pelo tecido (Brown & Taylor, 1996). Isto confere a este agonista maior estabilidade, razão pela qual, nestes experimentos, optamos por usar CCh ao invés de ACh, utilizada em estudos anteriores (Godoy *et al.*, 1999).

Nestes experimentos, IT controle foi obtido em 1 a 3 episódios antes da adição de CCh. A seguir, adicionou-se ao banho 0,6  $\mu$ M CCh, concentração esta determinada em experimentos preliminares como efetiva para alterar IT e produzir efeito cronotrópico negativo (nosso marcador da ativação colinérgica muscarínica), sem, no entanto, levar à interrupção da atividade elétrica espontânea do átrio. Após um período de 10 min. para estabilização do efeito do CCh, IT foi novamente determinado. A seguir, dependendo do protocolo experimental, era adicionado outro fármaco, ou a preparação era lavada. Em qualquer caso, IT era determinado mais uma vez.

Para confirmar se os efeitos do CCh sobre IT eram mediados por receptores colinérgicos muscarínicos, foram realizados alguns experimentos, nos quais a adição de CCh era precedida por incubação do átrio com atropina (bloqueador competitivo deste tipo

de receptores, Brown & Taylor, 1996), na concentração de 1  $\mu$ M, por 30 min. Neste caso, IT foi determinado em condição controle, na presença de atropina e na presença de atropina + CCh.

### **3.5.3.2 Efeitos do Isoproterenol (ISO)**

O ISO, assim como a adrenalina e noradrenalina (mediadores químicos da eferência autonômica simpática), atua por meio da ocupação de receptores adrenérgicos, sendo um potente agonista seletivo para receptores adrenérgicos do tipo  $\beta$  (Hoffman & Lefkowitz, 1996). Neste trabalho, estudamos o efeito do ISO sobre a indução de taquiarritmias, na ausência de outros fármacos (i.e., sobre a indução pela estimulação elétrica apenas) ou após adições prévias.

Foi utilizada uma concentração de ISO de 10 nM (valor submáximo, mas maior que a concentração necessária para evocar uma resposta cronotrópica igual a 50% da resposta máxima nesta preparação (Bassani & Moraes, 1988; Bassani & Bassani, 1991). A determinação de IT foi iniciada 2 min. após a adição de ISO ao banho, quando seu efeito cronotrópico positivo havia se estabilizado. Nesta série de experimentos, IT foi determinado em 8 tentativas, tanto na ausência, quanto na presença de ISO.

### **3.5.3.3 Efeitos da L-Arginina (L-Arg)**

O óxido nítrico (NO) é um metabólito que tem sido implicado na geração de certas ações colinérgicas em vários tecidos, inclusive no músculo atrial (Wang *et al.*, 1998; Choate & Paterson, 1999). A produção de NO é catalisada pela enzima NO-sintase. Como o NO é altamente volátil, o que torna bastante difícil sua aplicação ao tecido, utilizamos neste estudo a L-Arg, que é um substrato para a NO-sintase endógena, para aumentar a produção de NO pelo tecido, sem estimulação do receptor colinérgico muscarínico.

Nesta série de experimentos, IT foi determinado com 3 episódios sucessivos de 6 tentativas cada um. Em cada episódio, utilizou-se uma diferente configuração de trens estimulatórios. Os mesmos protocolos foram usados tanto na condição controle, quanto após a adição de L-Arg ao banho. L-Arg foi utilizada na concentração de 1-5 mM (Wang *et al.*, 1998; Choate & Paterson, 1999). A determinação de IT foi iniciada 30 min. após a

adição do fármaco. Em alguns experimentos, testou-se períodos de incubação mais longos, de até 3 horas.

#### **3.5.3.4 Efeitos da 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)**

Considera-se que a maior parte dos efeitos de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos é mediada pela estimulação da produção de um mediador químico intracelular, o 3', 5'-monofosfato de adenosina cíclico, ou AMP-cíclico (cAMP). A síntese deste mediador é catalisada pela enzima adenilato-ciclase, associada indiretamente com o receptor  $\beta$ -adrenérgico. Já a degradação do cAMP é catalisada por uma família de enzimas conhecidas como fosfodiesterases (Mayes, 1990). A IBMX é um inibidor não-seletivo das fosfodiesterases, apresentando um efeito semelhante ao da estimulação  $\beta$ -adrenérgica, no que diz respeito a aumento da acumulação intracelular de cAMP, sem, no entanto, envolver a ativação da via do receptor  $\beta$ -adrenérgico - adenilato-ciclase (Granner, 1990).

O efeito da IBMX sobre a indução de taquiarritmias foi investigado na ausência de outro fármaco e também após adição de CCh. Foram utilizados episódios com as 3 configurações descritas no item 3.5.2.3, com 8 tentativas cada. Selecionou-se a concentração de IBMX de 100  $\mu$ M, com base em experimentos preliminares e na relação entre concentração de IBMX e acúmulo de cAMP em tecido cardíaco, descrita na literatura (Hayes *et al.*, 1986; Bethke *et al.*, 1992; Jurevicius & Fischmeister, 1996). A determinação do IT na presença de IBMX foi iniciada quando se observou estabilização de seu efeito cronotrópico (15-30 min.).

Para testar se a IBMX poderia exercer seus efeitos parcialmente pela ocupação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, realizou-se alguns experimentos nos quais IBMX era aplicado após o bloqueio destes receptores (30 min. após incubação com 1  $\mu$ M propranolol).

Também foi testado o efeito de uma outra metil-xantina inibidora das fosfodiesterases, a cafeína, que é menos potente que a IBMX. Cafeína foi usada na concentração de 5 mM, e o procedimento foi semelhante ao usado para a IBMX.

### **3.5.3.5 Efeitos do Amiodarone (AMI)**

O amiodarone é um agente anti-arrítmico, frequentemente utilizado na clínica cardiológica para terapia de arritmias, inclusive as de origem atrial (Ukani & Ezekowitz, 1995; Prystowsky *et al.*, 1996).

Neste estudo, testou-se o efeito do amiodarone (1-10  $\mu\text{M}$ ) sobre a inducibilidade de taquiarritmias, tanto na ausência de outro agente farmacológico, quanto após facilitação desta indução por adição de CCh ao banho. Assim como para a IBMX, foram utilizados os 3 tipos de protocolos experimentais citados anteriormente. Observou-se um tempo de incubação com amiodarone de 30 min. antes do início da obtenção de IT.

### **3.5.3.6 Efeitos do Verapamil (VERA)**

É comum a utilização de bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana no tratamento de arritmias cardíacas (Ukani & Ezekowitz, 1995; Prystowsky *et al.*, 1996). Portanto, também investigamos neste estudo o efeito do verapamil, bloqueador destes canais, sobre a indução de arritmia por estimulação elétrica.

Verapamil (1  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado ao banho após a administração de CCh. A determinação de IT foi iniciada após 15 min. de incubação com verapamil.

## **3.6 SOLUÇÕES**

A solução fisiológica utilizada para manutenção da preparação *in vitro* foi a solução de Krebs-Henseleit (K-H), com a seguinte composição química: 127,4 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12,6 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 11,1 mM glicose, pH 7,4 a 36,5 °C. Deve-se mencionar que periodicamente o pH da solução K-H era titulado com  $\text{NaHCO}_3$  e, portanto, a concentração deste sal dependia da quantidade necessária para obtenção do pH desejado. A concentração de NaCl também variava, pois era ajustada de acordo com a concentração de  $\text{NaHCO}_3$ , para que a concentração final de  $\text{Na}^+$  fosse constante, de 140 mEq/l. Portanto, os valores supracitados referem-se a valores médios. Em experimentos nos quais ISO foi usada, incluiu-se 2 mM de

ácido ascórbico, para minimizar a oxidação da catecolamina. Para o preparo da solução K-H, utilizou-se sais de padrão analítico e água destilada e deionizada.

Todos os fármacos utilizados foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Com exceção da cafeína, L-Arg (que foram adicionadas como sólidos), do amiodarone e do verapamil (dissolvidos em etanol), os demais fármacos foram diluídos a partir de soluções-estoque aquosas com as seguintes concentrações: 40 mM CCh (Sigma C4382); 10 mM sulfato de atropina (Sigma A9547); 20 mM cloridrato de (-)-ISO (Sigma I6504); 4 mM cloridrato de propranolol (Sigma P0884); 10 mM IBMX (Sigma I5879).

L-Arg (Sigma A5949) foi preparada na concentração de 10 mM em solução K-H, imediatamente antes do uso. Como este fármaco causa alcalinização, o pH da solução foi corrigido para 7,4 com HCl. A seguir, parte da solução do banho foi substituída pela solução de L-Arg, para obtenção da concentração desejada. O mesmo procedimento foi usado com cafeína (Sigma C0750), porém, neste caso, não foi necessária correção de pH.

No caso do cloridrato de amiodarone (Sigma A8423), uma solução-estoque de 10 mM foi preparada em etanol P.A., devido à baixa solubilidade do sal em água. Porém, isto significava que a adição de 100  $\mu$ M de amiodarone implicava na adição conjunta de etanol a 1%. Experimentos preliminares nos quais apenas o veículo foi administrado revelaram ausência de efeito do etanol nesta concentração sobre a frequência espontânea e a resposta atrial à estimulação elétrica. Para o cloridrato de verapamil (Sigma V4629), procedeu-se à preparação de uma solução-estoque com concentração de 5 mM do sal em etanol P.A., da qual eram utilizados apenas 4  $\mu$ l em cada ensaio (adição de etanol em apenas 0,02%).

Deve-se ainda ressaltar que todas as diluições foram feitas imediatamente antes do uso e que, durante os experimentos com verapamil, a câmara contendo o átrio foi protegida da luz, devido à alta fotossensibilidade deste composto.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados com médias  $\pm$  valores de erro-padrão da média (EPMS).

Para a análise de IT, foi utilizada análise de variância monofatorial para amostras pareadas, com a aplicação *post-hoc* de teste de Student-Neumann-Keuls para comparação dos contrastes. Análise preliminar dos dados utilizando a análise de variância de *ranks* (teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico) produziu resultados semelhantes aos obtidos com a análise de variância convencional (paramétrica).

Para comparação das freqüências atriais espontâneas na presença e ausência de fármacos, utilizou-se o teste *t* de Student para amostras pareadas.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A hipótese nula (i. e., ausência de diferenças significativas) foi rejeitada quando sua probabilidade foi menor ou igual a 5% ( $p \leq 0,05$ ).



## **Capítulo 4**

### **Resultados**

## 4.1 SISTEMA PARA ESTIMULAÇÃO ATRIAL POR CAMPO ELÉTRICO

O sistema desenvolvido para estimulação por campo elétrico, com montagem horizontal do AD (**Figura 3.2**), mostrou-se satisfatório e eficiente. Entre as vantagens obtidas com esta montagem, pode-se citar:

- a) Valores relativamente baixos do limiar de tensão para LI ( $1,1 \pm 0,4V \times 2,5 \pm 0,2V$  para a montagem horizontal): Isto foi possível graças ao posicionamento horizontal do átrio, pois tal disposição implica na necessidade de uma menor altura para a coluna de líquido na cuba (mantendo os eletrodos próximos ao tecido), o que, conseqüentemente, concentra as linhas de campo elétrico na região do átrio, elevando a intensidade do campo nesta região. Em resumo, a disposição horizontal do átrio permite um melhor aproveitamento do campo elétrico gerado pelos eletrodos de estimulação.
- b) Flexibilidade no posicionamento dos eletrodos: A montagem horizontal, tal como foi concebida facilita o acesso ao átrio e o posicionamento dos eletrodos de estimulação e captação. Isto permite a escolha da melhor posição para uma estimulação mais eficaz e para a obtenção de um melhor sinal de eletrograma. A flexibilidade de posicionamento dos eletrodos de captação e de estimulação nos possibilitou dispor tais eletrodos de maneira aproximadamente perpendicular (Fig. 3.2). Este posicionamento minimiza o artefato de estímulo, ou seja, a influência do sinal estimulatório sobre o eletrograma.
- c) Menor grau de lesão do tecido: O empalamento do eletrodo tetrapolar, na montagem vertical, produz lesão do tecido atrial, o que não ocorre na montagem horizontal devido ao uso de eletrodos externos. Um benefício adicional é a possibilidade de uso de preparações de menores dimensões (de animais mais jovens), pois não mais é necessária uma grande área de tecido atrial para empalamento do eletrodo tetrapolar.

No entanto, há também algumas desvantagens, tais como:

- a) Maior dificuldade para registro simultâneo da força de contração desenvolvida pela preparação: Esta dificuldade pode ser contornada com o uso de transdutores mecânicos horizontais, ou com um parafuso/polia para produzir um ângulo de 90° no fio preso ao átrio, o que possibilitaria o uso de transdutores verticais (embora com amortecimento do sinal);
- b) Maior dificuldade para esgotamento da câmara de incubação: Muitas vezes, é necessária a troca de solução de incubação. A cuba utilizada para a montagem vertical apresenta uma saída em sua base, o que permite o rápido esgotamento da solução nela contida, por gravidade. Na montagem horizontal, é necessário o uso de uma ponta ligada a um sistema de vácuo, o que requer maior cuidado no esgotamento do conteúdo da câmara.

## **4.2 TAQUIARRITMIA ATRIAL PRODUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA**

Em condições controles (i.e., na ausência de fármacos), no conjunto dos protocolos estimulatórios utilizados, obtivemos num total de 75 preparações:

- a) Freqüência atrial espontânea:  $169 \pm 4$  batimentos por min (bpm);
- b) *IT*:  $0,40 \pm 0,04$ ;
- c) *Freqüência média das taquiarritmias*:  $16,5 \pm 0,07$  Hz;
- d) *Duração média das taquiarritmias*:  $12,8 \pm 4,6$  s (deve-se ressaltar que, como já exposto, quando a taquiarritmia durava mais de 15 s, procedia-se à estimulação elétrica para sua reversão, daí o baixo valor médio supracitado).

A inducibilidade e a freqüência média das taquiarritmias obtidas neste trabalho foram bastante próximas daquelas obtidos por Godoy *et al.* (1999) na mesma preparação, que encontraram indução com 1-6 tentativas (estes autores não estimaram *IT*) e taquiarritmia com freqüência entre 14 e 25 Hz. Isto indica que em ambos os estudos, o fenômeno observado parece ter sido o mesmo.

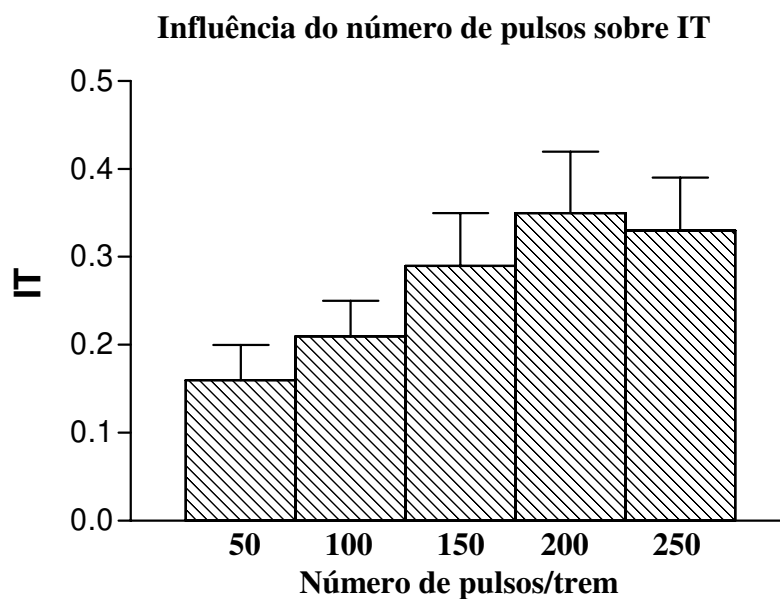
## 4.3 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS ESTIMULATÓRIOS SOBRE A INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA ATRIAL

### 4.3.1 Número de pulsos por trem estimulatório

Os resultados relativos ao estudo da influência do número de pulsos por trem sobre IT estão resumidos na **Tabela 4.I** e encontram-se representados na **Figura 4.1**. Embora possa ser observada uma tendência de menor IT para trens com menor número de pulsos, a análise estatística não indicou diferenças significativas.

**Tabela 4.I** -Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) obtidos com trens estimulatórios a 66.7 Hz, contendo diferentes números de pulsos (Número de réplicas (N) = 16).

Número de pulsos	50	100	150	200	250
IT	0,16 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,06



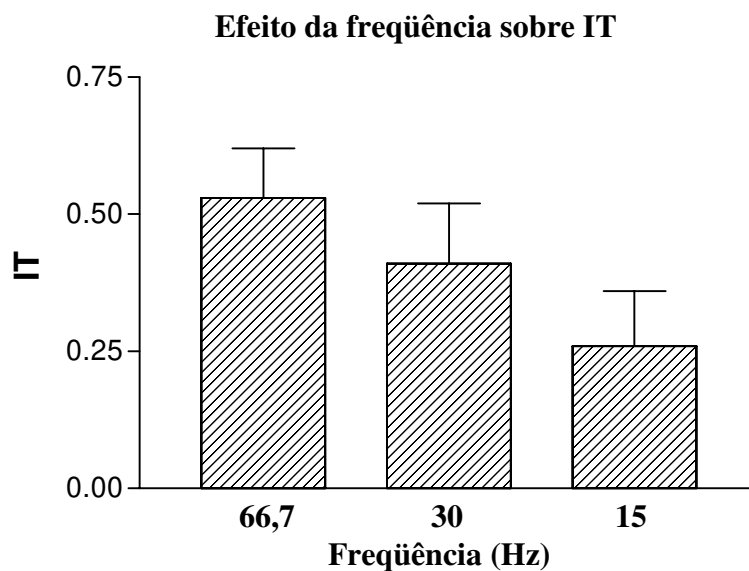
**Figura 4.1** – Valores médios de IT, após trens estimulatórios a 66,7 Hz, com diferentes números de pulsos. As linhas verticais indicam os erros padrões das medias (EPM), (N = 16).

### 4.3.2 Frequência do trem estimulatório

A **Tabela 4.II** apresenta os resultados envolvendo o estudo da influência da frequência do trem estimulatório (250 pulsos/trem) sobre IT. A **Figura 4.2** ilustra tais resultados. Assim como o observado para o número de pulsos, pode ser notada uma tendência de aumento de IT com o aumento da frequência do trem. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

**Tabela 4.II** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) obtidos com trens estimulatórios de 250 pulsos a diferentes frequências (N = 10).

Frequência (Hz)	15	30	66,7
IT	0,26 $\pm$ 0,10	0,41 $\pm$ 0,11	0,53 $\pm$ 0,09



**Figura 4.2** – Valores médios de IT, após trens estimulatórios com 250 pulsos, a diferentes frequências. As linhas verticais indicam os EPM (N = 10).

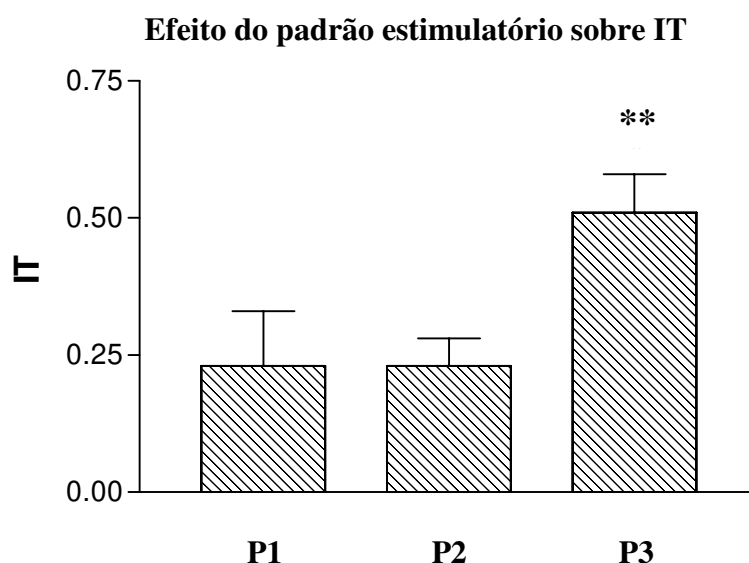
### 4.3.3 Padrão de apresentação de pulsos (teste do trem triplo)

Partindo de observações experimentais preliminares, testamos um novo protocolo estimulatório (o trem triplo), quanto à sua efetividade na indução de taquiarritmias. Este protocolo (aqui denominado P3) foi comparado com 2 configurações de trens simples: os chamados P1 (trem com 50 pulsos a 30 Hz) e P2 (trem com 250 pulsos a 66,7 Hz). As configurações P1 e P2 foram anteriormente utilizadas por Godoy *et al.* (1999). P3 é a configuração ilustrada na **Figura 3.4c**.

Os resultados estão apresentados na **Tabela 4.III** e ilustrados na **Figura 4.3**. Como podemos observar, P3 mostrou-se mais eficiente do que P1 ou P2 para induzir taquiarritmias ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 4.III** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) obtidos com trens estimulatórios simples de 50 pulsos a 30 Hz (P1) e de 250 pulsos a 66,7 Hz (P2), bem como com o trem triplo (P3). N = 24. \*\* indica  $p < 0,01$ .

Protocolo	P1	P2	P3
IT	0.23 $\pm$ 0,10	0.23 $\pm$ 0,05	0.51 $\pm$ 0,07 **



**Figura 4.3** – Valores médios de IT, após diferentes protocolos estimulatórios (P1,P2 e P3, vide texto). As linhas verticais indicam os EPM (N = 24, \*\*  $p < 0,01$ ).

## 4.4 INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS SOBRE A INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA

### 4.4.1 Efeitos da Carbamilcolina (CCh)

Os resultados relativos à influência da CCh (0,6  $\mu$ M) sobre IT encontram-se apresentados na **Tabela 4.IV** e ilustrados na **Figura 4.4**. Ressalta-se que nesta série de experimentos, selecionou-se preparações que apresentavam um baixo valor de IT de controle (compare com o valor médio apresentado no item 4.2), para melhor observação do efeito da CCh.

CCh, na concentração utilizada, apresentou um efeito cronotrópico negativo significativo, reduzindo a frequência atrial espontânea de  $168 \pm 5$  para  $68 \pm 6$  bpm (N = 28,  $p < 0,01$ ).

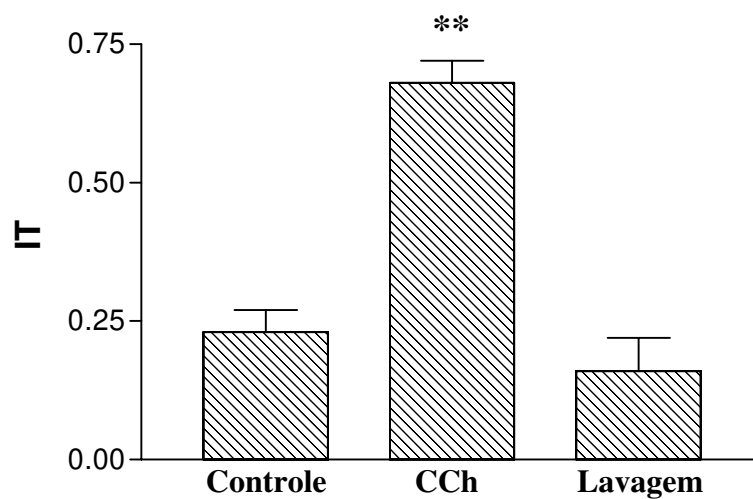
Apesar da depressão do automatismo atrial, CCh aumentou IT significativamente ( $p < 0,01$ ), mostrando ser arritmogênica nesta preparação, do mesmo modo que a ACh (Godoy *et al.*, 1999). O efeito da CCh foi reversível após a lavagem da preparação, e foi abolido pela presença de 1  $\mu$ M de atropina no banho (IT = 0,28 em condição controle; IT = 0,80 na presença de CCh; e IT = 0,33 na presença de CCh + atropina), o que indica que o efeito da CCh sobre IT é mediado pela ocupação de receptores colinérgicos muscarínicos no tecido atrial.

A **Figura 4.5** mostra registros de eletrograma atrial na ausência (A) e na presença (B) de CCh (observe taquiarritmia evocada pela estimulação na presença de CCh).

**Tabela 4.IV** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) no átrio direito isolado de rato na ausência de fármacos (controle, N = 23), na presença de 0,6  $\mu$ M CCh (N = 23), e após remoção da CCh (lavagem, N = 6). \*\* indica  $p < 0,01$  com relação ao controle.

	Controle	CCh	Lavagem
IT	$0,23 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,04$ **	$0,16 \pm 0,06$

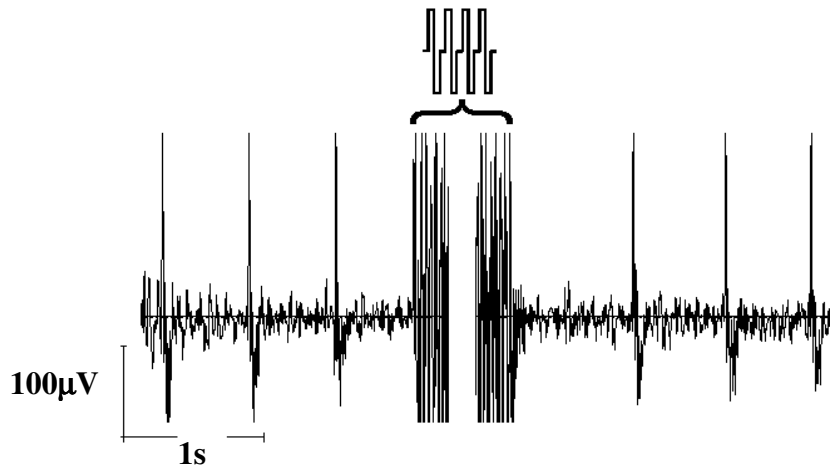
### Efeito do CCh sobre IT



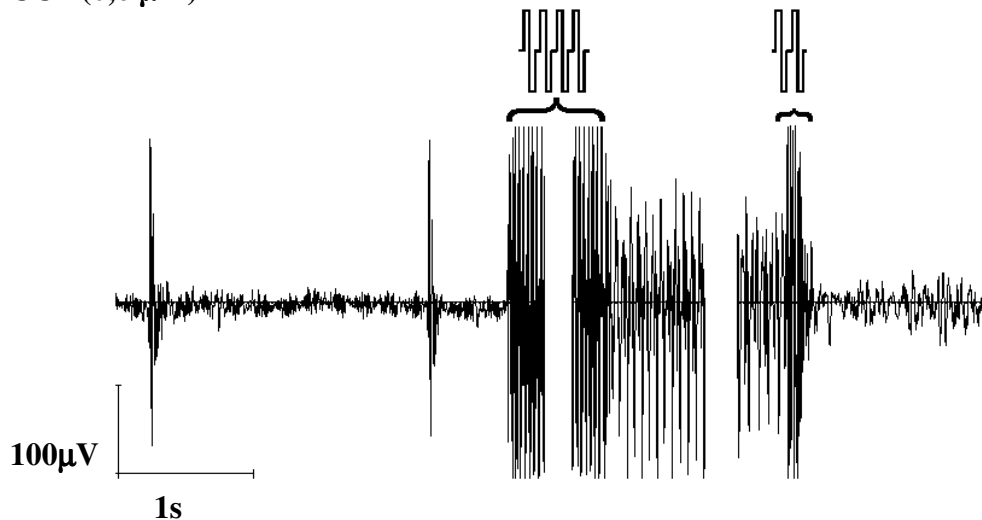
**Figura 4.4** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 0,6  $\mu$ M CCh e após lavagem do CCh. As linhas verticais indicam os EPM (N = 23, \*\* p<0,01).



(a) Controle:



(b) CCh (0,6 μM)



**Figura 4.5** – (a) Registro do eletrograma atrial de controle mostrando uma tentativa, sem a ocorrência de taquiarritmia. (b) Registro obtido após a adição de CCh (0,6 μM) ao meio, onde podemos verificar uma tentativa com a ocorrência de taquiarritmia (observe que a estimulação foi repetida para reverter a arritmia). Comparando os registros (A) e (B), podemos observar claramente o efeito cronotrópico negativo do CCh.

#### 4.4.2 Efeitos do Isoproterenol (ISO)

ISO (10 nM), como esperado, apresentou um significativo efeito cronotrópico positivo, elevando a frequência atrial de  $157 \pm 7$  para  $273 \pm 16$  bpm (N = 12,  $p < 0.01$ ).

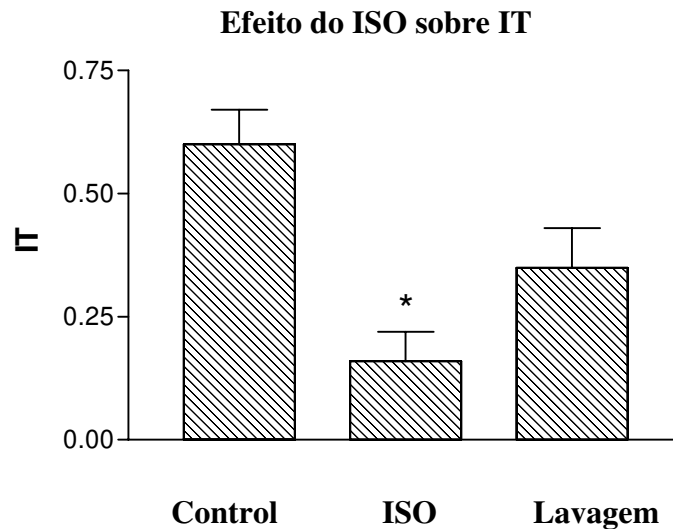
No entanto, ISO apresentou um efeito inibitório sobre a evocação de taquiarritmias, causando uma redução significativa de IT, como pode ser observado na **Tabela 4.V-a** e nas **Figuras 4.6** e **4.7**. Mais uma vez, foram selecionados para este experimento átrios que apresentavam elevado valor de IT, em condição controle, para melhor observação do efeito do ISO. O efeito anti-arrítmico do ISO não apresentou completa reversão após a remoção do fármaco. Isto não é incomum, especialmente após exposição prolongada a concentrações relativamente baixas do fármaco, provavelmente por causa de ativação duradoura da cascata bioquímica acoplada aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. No caso deste estudo, a longa exposição não pôde ser evitada, uma vez que foi necessária a aplicação de diversos protocolos de estimulação na presença de ISO.

Deste modo, CCh e ISO mostraram claro antagonismo, tanto no efeito cronotrópico (o primeiro com efeito negativo e o segundo com efeito positivo), quanto na influência sobre a inducibilidade de taquiarritmia (o primeiro mostrou-se pró-arrítmico, enquanto o segundo mostrou-se anti-arrítmico). No entanto, o efeito do ISO foi diferente quando aplicado a preparações já expostas a CCh: ISO (10 nM) não foi capaz de reverter o efeito cronotrópico negativo do CCh (frequência atrial de  $154 \pm 5$ ,  $45 \pm 17$  e  $72 \pm 14$  bpm nas condições controle, CCh e CCh + ISO, respectivamente, N = 4). Do mesmo modo, esta concentração de ISO não reduziu IT, previamente aumentado por CCh, sendo necessário um aumento de sua concentração para atenuar o efeito pró-arrítmico do agonista muscarínico (**Tabela 4.V-b**).

**Tabela 4.V** – Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) no átrio direito isolado de rato na ausência de fármacos (controle), e na presença de 10 nM ISO e/ou 0,6  $\mu$ M CCh. Na secção **a**, ISO foi adicionado inicialmente, e depois removido do meio (Lavagem) (N = 12). Na secção **b**, ISO foi administrado após adição de CCh (0,6 $\mu$ M), procedendo-se também à adição de concentrações maiores (50-200 nM) de ISO (N = 4). \* e \*\* indicam  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, com relação ao controle.

(a)	Controle	ISO	Lavagem
IT	$0,60 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,06$ *	$0,35 \pm 0,08$

(b)	Controle	CCh	CCh + ISO (10 nM)	CCh + ISO (50-200 nM)
IT	$0,20 \pm 0,12$	$0,72 \pm 0,10$ **	$0,97 \pm 0,03$ **	$0,48 \pm 0,20$



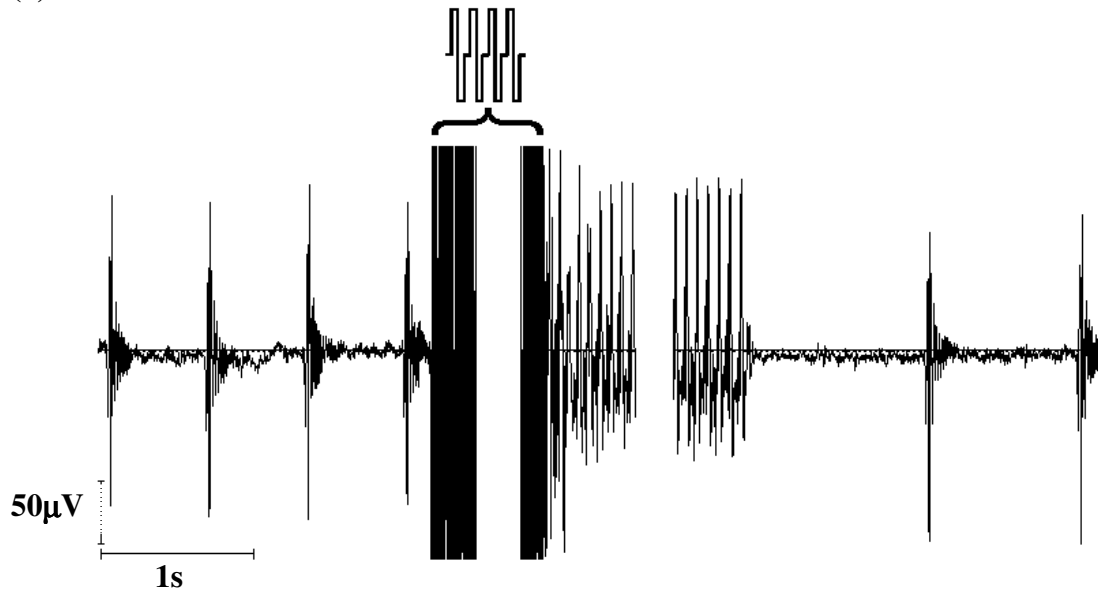
**Figura 4.6** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 10 nM ISO e após lavagem do ISO. As linhas verticais indicam os EPM (N = 12, \* p<0,5).

#### 4.4.3 Efeitos da (3 – isobutil – 1 – metilxantina (IBMX)) e da Cafeína

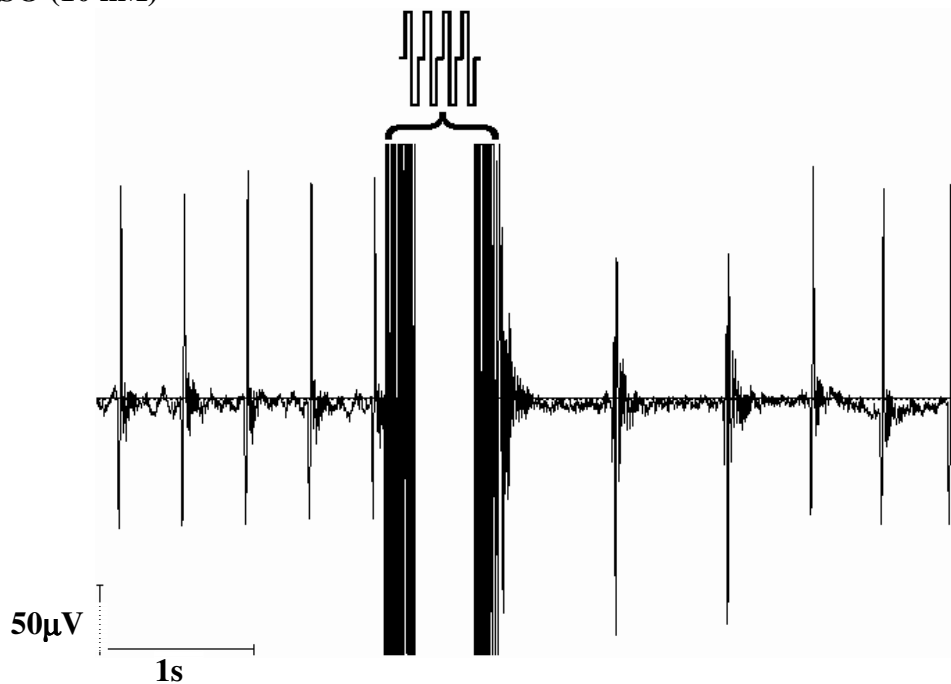
Uma vez que a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos aumenta o acúmulo intracelular de cAMP (Opie, 1998), levantamos a possibilidade de que este fenômeno poderia estar envolvido no efeito anti-arrítmico do ISO. Para testá-la, utilizamos IBMX e cafeína, que também aumentam o nível de cAMP, mas por um outro mecanismo (por inibição da degradação do cAMP), que é independente da ocupação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Utilizamos concentrações relativamente altas (100  $\mu$ M IBMX e 5 mM cafeína), para acelerar o efeito dos fármacos, que é bastante lento. Como ambos os compostos tiveram efeitos idênticos, os resultados dos 3 experimentos realizados com cafeína foram incorporados ao lote de experimentos com IBMX.

IBMX apresentou um efeito cronotrópico positivo semelhante ao do ISO: elevou a frequência atrial de  $159 \pm 17$  para  $292 \pm 37$  bpm (N = 5, p< 0,01). Ainda de modo semelhante ao ISO, IBMX reduziu IT significativamente (p< 0,05). Esta redução, no entanto, pôde ser revertida pela adição de 0,6  $\mu$ M CCh ao banho (na presença de IBMX), como mostram a **Tabela 4.VI-a** e a **Figura 4.8**.

(a) Controle:



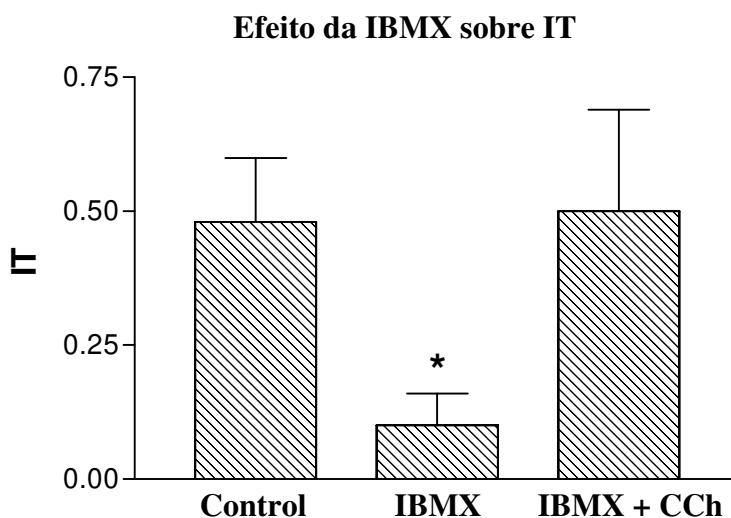
(b) ISO (10 nM)



**Figura 4.7** – (a) Registro do eletrograma atrial de controle mostrando uma tentativa, com sucesso na indução de taquiarritmia. (b) Registro obtido após a adição de ISO (10 nM) ao banho, onde podemos verificar a falha da estimulação em evocar taquiarritmia. Observe o marcante efeito cronotrópico positivo do ISO, comparando os registros (A) e (B).

**Tabela 4.VI** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) no átrio direito isolado de rato na ausência de fármacos (controle), e na presença de 100  $\mu$ M IBMX e/ou 0,6  $\mu$ M CCh. Na secção **a**, IBMX foi adicionada inicialmente, com posterior adição de CCh (N = 5). Na secção **b**, a ordem de adição dos fármacos foi invertida (N = 5). \* e \*\* indicam  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, com relação ao controle.

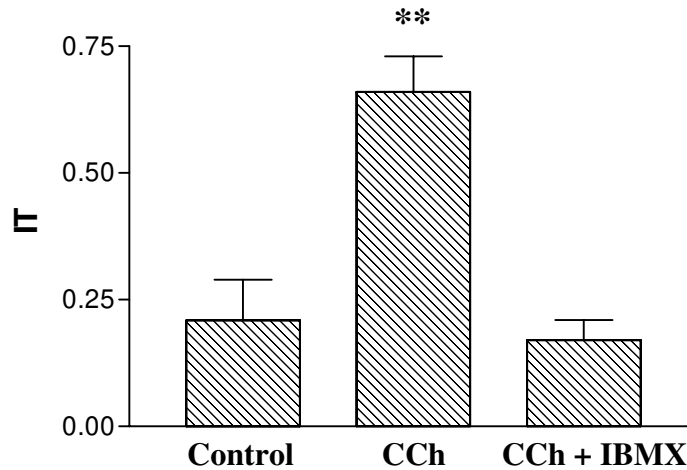
(a)	Controle	IBMX	IBMX + CCh
IT	0,48 $\pm$ 0,12	0,10 $\pm$ 0,06 *	0,50 $\pm$ 0,19
(b)	Controle	CCh	CCh + IBMX
IT	0,21 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,07 **	0,17 $\pm$ 0,04



**Figura 4.8** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 100  $\mu$ M IBMX, e de IBMX + 0,6  $\mu$ M CCh. As linhas verticais indicam os EPM (N = 5, \*  $p < 0,5$ ).

Foram também realizados experimentos nos quais a inducibilidade de arritmia foi facilitada com adição de CCh, previamente à adição de IBMX. Neste caso, observamos que CCh elevou IT ( $P < 0,01$ ), como antes verificado. A posterior adição de IBMX (na presença de CCh) foi capaz de abolir o efeito do CCh (vide **Tabela 4.VI-b** e **Figura 4.9**).

### Efeito da IBMX sobre IT após adição de CCh



**Figura 4.9** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 0,6  $\mu$ M CCh, e de CCh + 100  $\mu$ M IBMX. As linhas verticais indicam os EPM (N = 5, \*\* p<0,01).

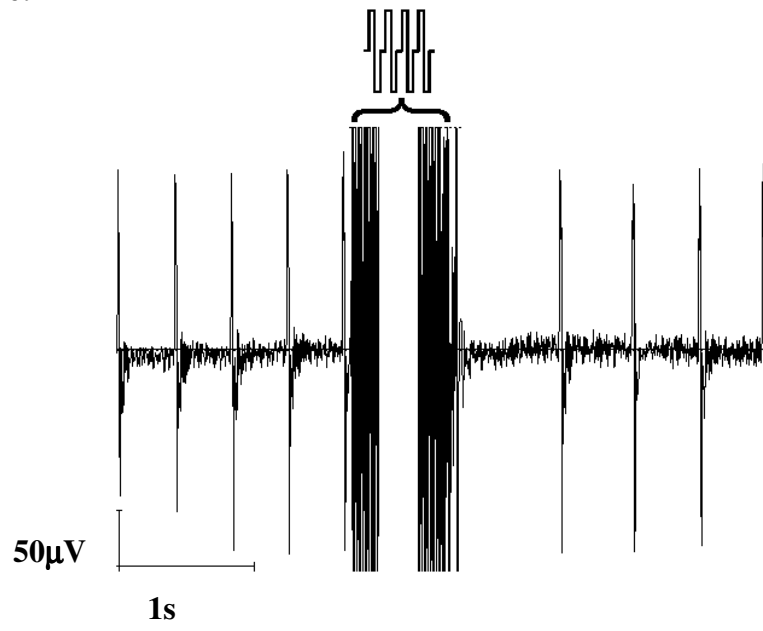
A **Figura 4.10** mostra registros originais de eletrograma atrial de condição controle, após adição de CCh e na condição CCh + IBMX.

Num único experimento, IBMX foi adicionada após incubação com 1  $\mu$ M propranolol (bloqueador de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) por 30 min, e não foi observada modificação de seus efeitos, o que indica que IBMX, na concentração utilizada, não parece causar ativação deste tipo de receptores.

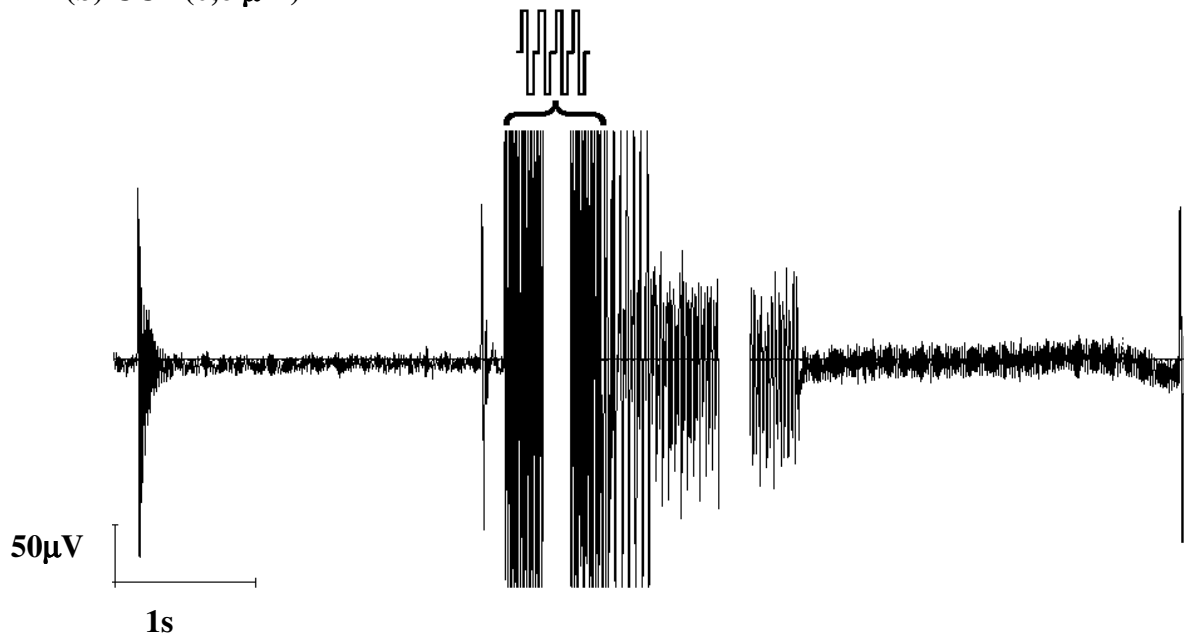
Nossos resultados, portanto, indicam que os efeitos cronotrópico e anti-arrítmico do ISO são mimetizados pelo IBMX. Além disso, foi possível demonstrar o antagonismo entre os efeitos do IBMX e do CCh, no que diz respeito à inducibilidade de taquiarritmia. No entanto, ao contrário do observado com ISO, IBMX foi capaz de reduzir IT mesmo após adição prévia de CCh.

**Fig. 4.10**

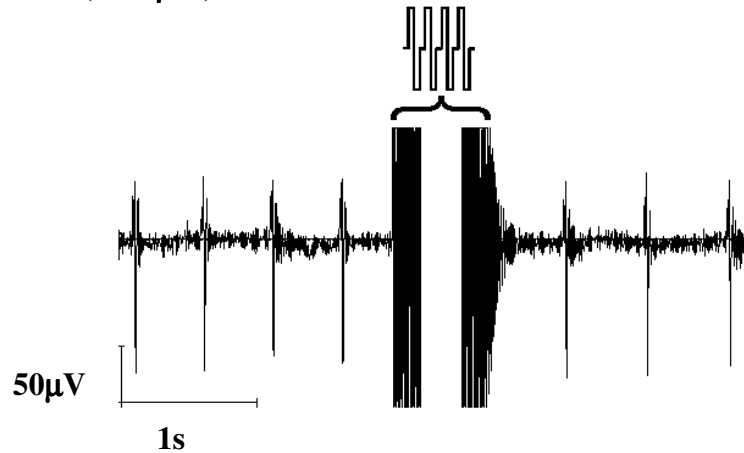
**(a) Controle:**



**(b) CCh (0,6  $\mu\text{M}$ )**



(c) CCh + IBMX ( 100  $\mu$ M)



**Figura 4.10** – (a) Registro do eletrograma atrial de controle mostrando uma tentativa, sem sucesso, na indução de taquiarritmia. (b) Registro obtido após a adição de CCh (0,6  $\mu$ M) ao meio, onde podemos verificar a indução de taquiarritmia. (c) Registro obtido após adição de 100  $\mu$ M IBMX, na presença de CCh, no qual a estimulação não causou taquiarritmia. A escala de tempo foi mantida nos 3 painéis para facilitar a observação dos efeitos cronotrópicos negativo do CCh e positivo do IBMX.

#### 4.4.4 Efeitos do Verapamil (VERA)

VERA é um bloqueador de canais de  $Ca^{2+}$ , utilizado clinicamente como agente anti-arrítmico. Este fármaco, na concentração de 1  $\mu$ M, apresentou forte efeito cronotrópico negativo, reduzindo a frequência atrial média de  $170 \pm 10$  para  $5 \pm 3$  bpm (N = 5,  $p < 0.01$ ), e abolindo a atividade elétrica atrial em 3 de 5 preparações.

Quando aplicado na ausência de outro fármaco, VERA aboliu a indução de taquiarritmias, a qual foi restaurada pela adição de 0,6  $\mu$ M CCh (é importante observar que CCh causou reaparecimento da indução de taquiarritmia apenas, mas não da atividade elétrica atrial espontânea nas preparações "paradas" por VERA). Isto pode ser observado na **Tabela 4.VII-a** e na **Figura 4.11**. ISO, adicionado a seguir, também não foi capaz de reduzir IT significativamente, tal como observado na ausência de VERA (vide 4.4.3).

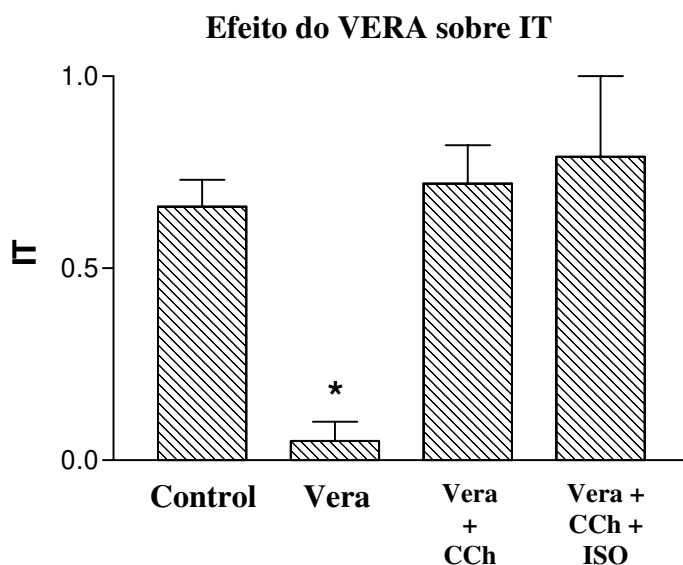
Curiosamente, o efeito de VERA não foi idêntico, quando aplicado após facilitação da indução de arritmia com CCh. Como pode ser visto na **Tabela 4.VII-b** e na **Figura 4.12**, CCh causou um aumento significativo de IT ( $p < 0.05$ ), como esperado. Porém, neste caso, a adição de VERA não produziu efeito anti-arrítmico significativo, e IT permaneceu alto. Novamente, ISO foi incapaz de diminuir IT, na presença de CCh + VERA.



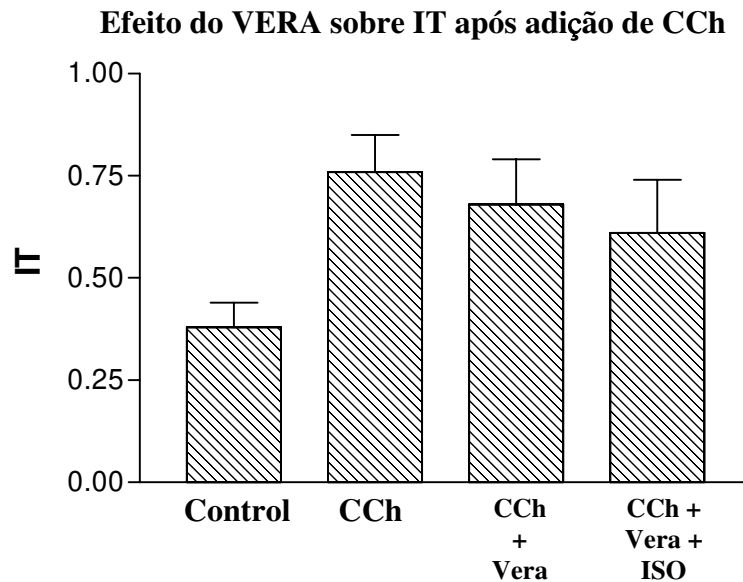
**Tabela 4.VII** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) no átrio direito isolado de rato na ausência de fármacos (controle), e na presença de 1  $\mu$ M VERA, 0,6  $\mu$ M CCh e 10 nM ISO. Na secção **a**, VERA foi adicionado inicialmente, com posterior adição de CCh (N = 5). Na secção **b**, a ordem de adição dos fármacos foi invertida, e realizou-se uma adição final de ISO (N = 4). \* indica  $p < 0,05$ , com relação ao controle.

(a)	Controle	VERA	VERA + CCh	VERA + CCh + ISO
IT	0,66 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,05 *	0,72 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,21

(b)	Controle	CCh	VERA+ CCh	CCh + VERA + ISO
IT	0,38 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,09 *	0,68 $\pm$ 0,11 *	0,61 $\pm$ 0,13 *



**Figura 4.11** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 1  $\mu$ M VERA, e de VERA + 0,6  $\mu$ M CCh e de VERA + CCh + 10 nM ISO. As linhas verticais indicam os EPM (N = 5, \*  $p < 0,5$ ).



**Figura 4.12** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 0,6  $\mu$ M CCh, de CCh + 1  $\mu$ M VERA, e de CCh + VERA + 10 nM ISO. As linhas verticais indicam os EPM (N = 4, \* p<0,5).

#### 4.4.5 Efeitos do Amiodarone (AMI)

AMI também é um agente anti-arrítmico amplamente utilizado na clínica médica para o tratamento de, entre outros distúrbios de ritmo, fibrilação atrial. Neste estudo, AMI foi utilizado na faixa de concentração de 1-10  $\mu$ M, na qual seu efeito pôde ser claramente observado.

AMI apresentou, assim como VERA, um efeito cronotrópico negativo, reduzindo a frequência atrial média de  $186 \pm 9$  para  $72 \pm 26$  bpm ( $p < 0,01$ ), sendo que em 3 de 8 preparações, a atividade elétrica detectável foi totalmente suprimida. O alto valor de EPMS após AMI indica que seu efeito foi bastante variável em preparações individuais.

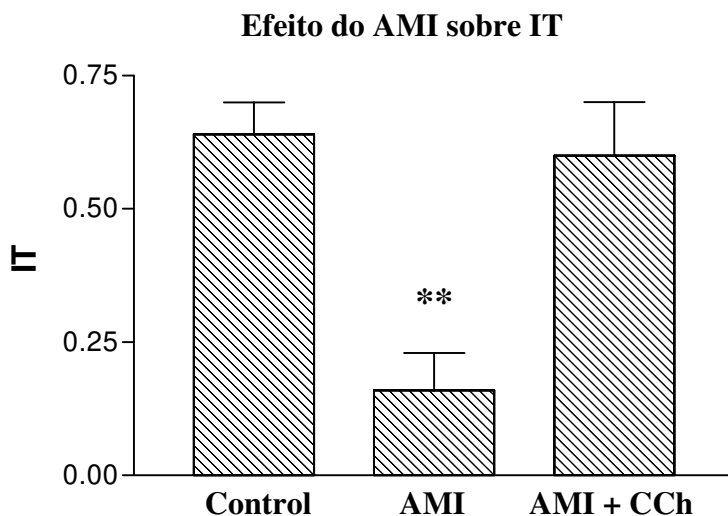
Nossos resultados, resumidos na **Tabela 4.VIII-a**, indicaram um efeito anti-arrítmico do AMI, quando aplicado na ausência de outros fármacos, com redução significativa de IT ( $p < 0,01$ ). Este efeito pôde ser revertido pela adição subsequente de CCh (vide também **Figura 4.13**).

Ao contrário do observado com ISO e VERA, AMI demonstrou ter efeito anti-arrítmico também quando aplicado após adição de CCh, como mostram a **Tabela 4.VIII-b**

e a **Figura 4.14**. Neste caso, o aumento significativo de IT por CCh ( $p < 0,01$ ) foi abolido por AMI.

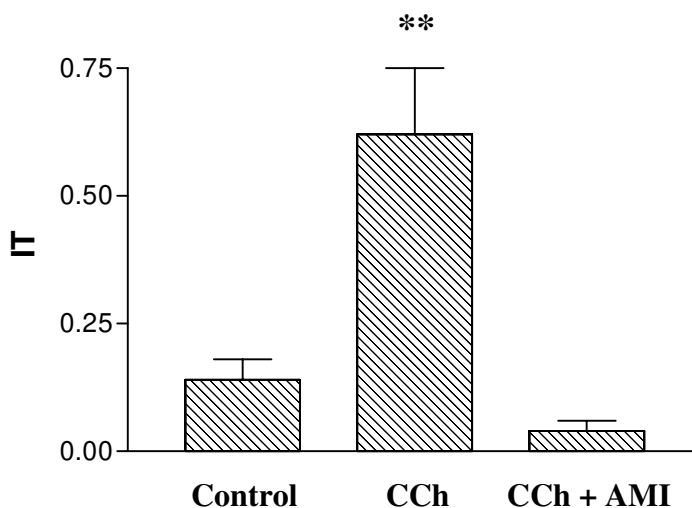
**Tabela 4.VIII** - Valores de IT (média  $\pm$  erro-padrão da média) no átrio direito isolado de rato na ausência de fármacos (controle), e na presença de 1-10  $\mu\text{M}$  AMI e/ou 0,6  $\mu\text{M}$  CCh. Na secção **a**, AMI foi adicionado inicialmente, com posterior adição de CCh ( $N = 8$ ). Na secção **b**, a ordem de adição dos fármacos foi invertida ( $N = 5$ ). \*\* indica  $p < 0,01$ , com relação ao controle.

(a)	Controle	AMI	AMI + CCh
IT	0,64 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,07 **	0,60 $\pm$ 0,10
<b>(b)</b>			
Controle	CCh	CCh + AMI	
IT	0,14 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,13 **	0,04 $\pm$ 0,02



**Figura 4.13** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 1-10  $\mu\text{M}$  AMI, e de AMI + 0,6  $\mu\text{M}$  CCh. As linhas verticais indicam os EPM ( $N = 8$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

### Efeito do AMI sobre IT após a adição de CCh



**Figura 4.14** – Valores médios de IT na ausência de fármacos (controle), na presença de 0,6  $\mu$ M CCh, e de CCh + 1-10  $\mu$ M AMI. As linhas verticais indicam os EPM (N = 5, \*\* p<0,01).

Na **Figura 4.15**, estão apresentados registros originais de eletrograma atrial em condição controle e após adição AMI, enquanto que na **Figura 4.16**, CCh foi adicionado antes da administração de AMI.

#### 4.4.6 Efeitos da L-Arginina (L-Arg)

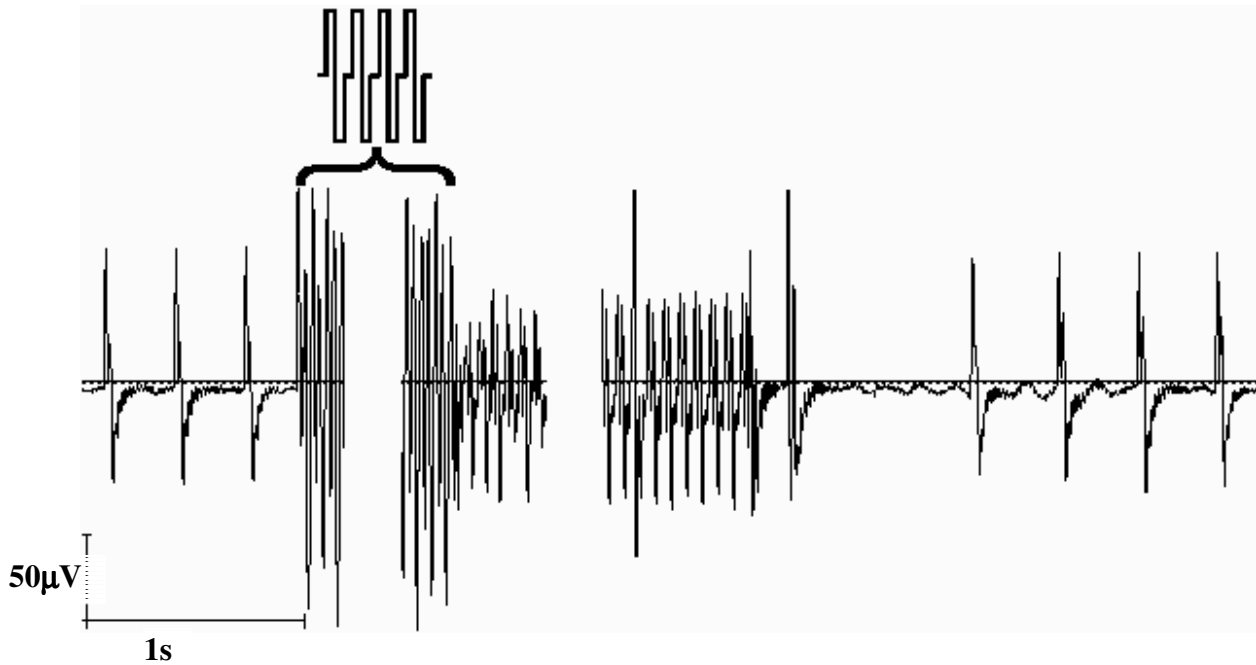
Estes experimentos tiveram por objetivo investigar se a produção de NO pelo tecido atrial está envolvida no efeito arritmogênico da CCh. Em caso positivo, seria esperado que a adição de L-Arg (substrato para a NO-sintase) mimetizasse o aumento de IT induzido pela adição de CCh.

Após 30 min de incubação com L-Arg (3-5 mM), observou-se redução da frequência atrial de  $156 \pm 3$  para  $119 \pm 16$  bpm (N = 4), que, no entanto, não atingiu significância estatística.

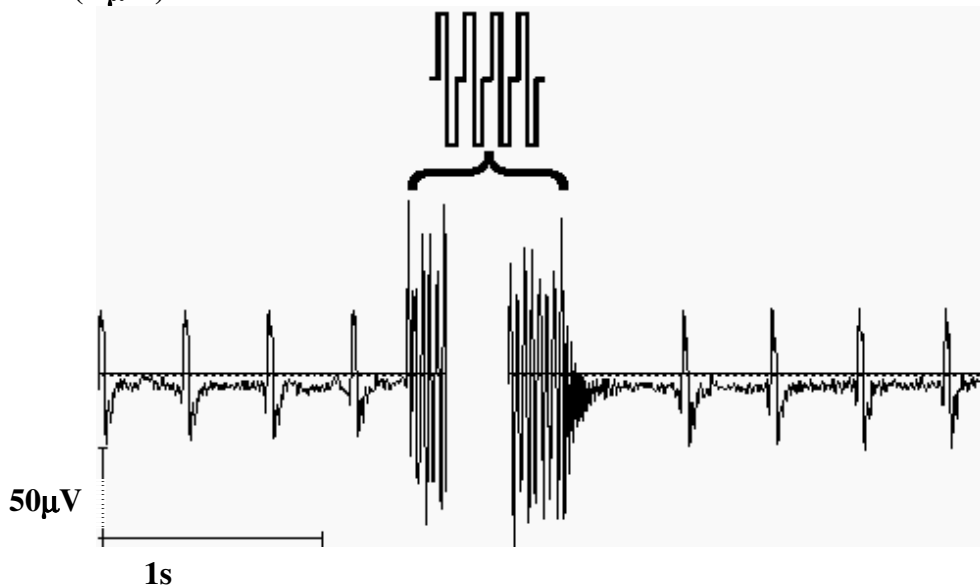
Inicialmente, aplicou-se 0,6  $\mu$ M CCh, que elevou IT de  $0,43 \pm 0,10$  para  $0,77 \pm 0,11$  (p< 0,05). A seguir, CCh foi removido do banho e L-Arg foi aplicada. Episódios de estimulação foram aplicados a cada 10 min. Após 30-40 min de exposição a L-Arg, o IT médio foi reduzido para 0,04 (isto é, a indução de taquiarritmia foi totalmente abolida em 3

de 4 preparações), o que mostra que L-Arg não só falhou em mimetizar o efeito arritmogênico da CCh, mas causou supressão da indução de arritmias.

**(a) Controle:**



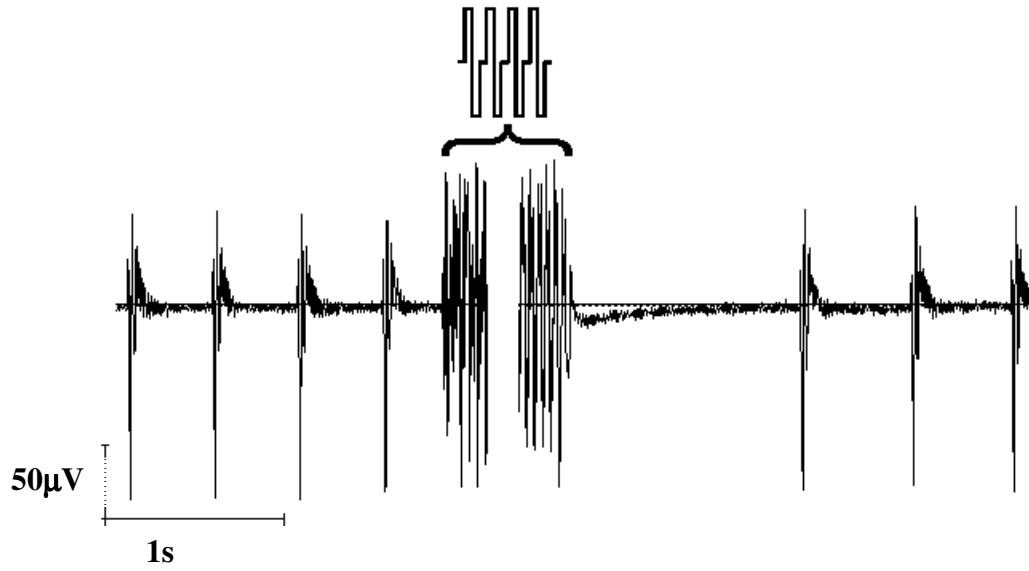
**(b) AMI (1 μM)**



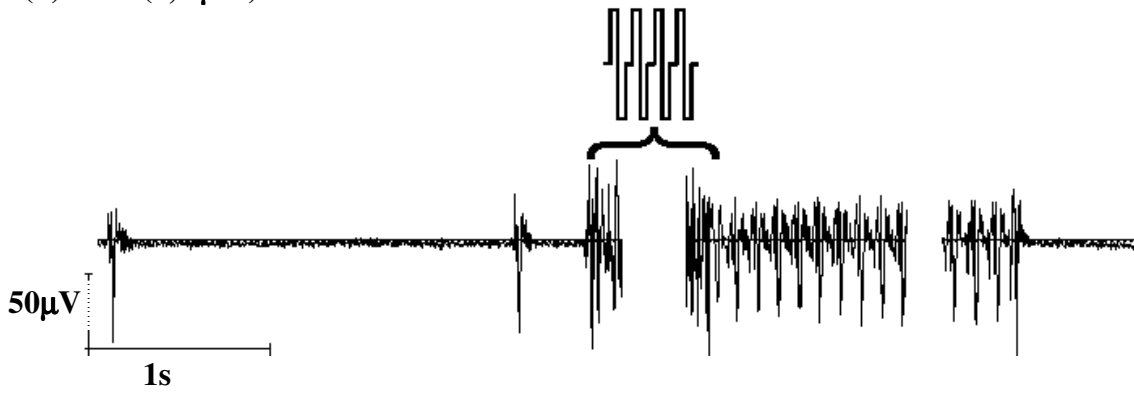
**Figura 4.15** – (a) Registro do eletrograma atrial de controle mostrando uma tentativa, com sucesso na indução de taquiarritmia. (b) Registro obtido após a adição de AMI (1 μM) ao meio, onde podemos verificar a falha da estimulação em evocar taquiarritmia. Neste caso, o efeito cronotrópico do AMI foi pouco acentuado.

**Fig. 4.16**

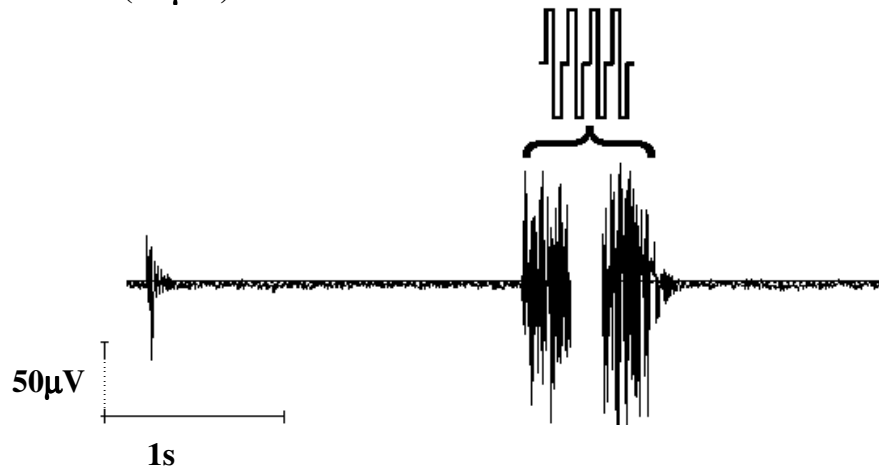
**(a) Controle:**



**(b) CCh (0,6  $\mu\text{M}$ )**



(c) CCh + AMI (10  $\mu$ M)



**Figura 4.16** – (a) Registro do eletrograma atrial de controle mostrando uma tentativa, sem sucesso na indução de taquiarritmia. (b) Registro obtido após a adição de CCh (0,6  $\mu$ M) ao meio, onde podemos verificar a indução de taquiarritmia. (c) Registro obtido após adição de 10  $\mu$ M AMI, na presença de CCh, no qual a estimulação não causou taquiarritmia. Observe que a forte redução da frequência atrial por CCh não foi alterada por AMI.

# Capítulo 5

## Discussão e Conclusões



No presente trabalho:

- a) Desenvolvemos uma nova montagem experimental para indução de taquiarritmia atrial (em átrio direito de rato isolado) por estimulação elétrica de alta frequência;
- b) Estudamos a influência de parâmetros estimulatórios como, por exemplo, frequência e número de pulsos, sobre a ocorrência de taquiarritmia por estimulação elétrica;
- c) Estudamos a influência de agentes farmacológicos sobre a ocorrência de taquiarritmia por estimulação elétrica, buscando maior entendimento dos mecanismos celulares envolvidos.

De acordo com os resultados descritos no capítulo anterior, podemos concluir que os objetivos propostos foram cumpridos.

## **5.1 MONTAGEM EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA ATRIAL POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA**

Embora tenha sido proposta uma montagem experimental para estimulação por campo elétrico, nossa experiência foi que uma estimulação mais efetiva era obtida com uma estimulação mista (i.e., um ou ambos os eletrodos estabelecendo contato físico com o tecido). As terminações nervosas atriais, no entanto, foram provavelmente estimuladas por campo elétrico. A montagem desenvolvida, na qual o átrio foi montado horizontalmente, envolve redução da altura da coluna de líquido na cuba, o que conseqüentemente, concentra as linhas de campo elétrico na região do átrio, elevando a intensidade do campo nesta região. Isto, comparado à montagem vertical tradicional, permite trabalhar com estímulos de menor intensidade e reduz a porcentagem de preparações descartadas devido à impossibilidade de produzir estimulação efetiva das terminações nervosas.

A flexibilidade de posicionamento dos eletrodos também otimizou o processo estimulatório, além de ter permitido a seleção da melhor posição dos eletrodos de registro.

Isto, associado à concentração das linhas de campo elétrico geradas pelo próprio tecido (devido à redução do volume condutor), contribuiu para a melhora da qualidade do sinal elétrico captado.

Como resultados destas modificações, obtivemos um valor médio de intensidade limiar para estimulação mais baixo do que o obtido com a montagem vertical ( $1,1 \pm 0,4$  V vs.  $2,5 \pm 0,2$  V), e um índice de indução de taquiarritmia relativamente alto em condições controle (correspondente a cerca de 40% das tentativas). Os principais benefícios da redução da intensidade do estímulo seriam menor dano causado pela estimulação ao tecido (por menor ocorrência de hidrólise, e provavelmente de produção de radicais livres) e aumento da qualidade do sinal eletrográfico, principalmente em experimentos de longa duração, devido à diminuição da taxa de descloração dos eletrodos de captação.

## **5.2 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS ESTIMULATÓRIOS SOBRE A INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA**

Considerando, como proposto por Godoy *et al.* (1999), o envolvimento da liberação de ACh endógena na ocorrência de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica, procuramos, neste trabalho, testar a influência de parâmetros estimulatórios (tais como o número de pulsos/trem e a frequência), com o objetivo de revelar uma possível relação entre a magnitude destes parâmetros e IT. Por exemplo, foi demonstrado que a liberação de ACh endógena é função da frequência de estimulação elétrica aplicada às células neurais parassimpáticas (Hirose *et al.*, 1997).

Nossos resultados indicaram uma tendência de aumento de IT associada com o aumento do número de pulsos por trem e da frequência do trem. No entanto, a análise estatística não revelou alteração significativa de IT em função destes parâmetros. É possível que isto tenha sido devido à alta variabilidade de IT entre diferentes preparações, e que esta diferença só fosse aparente numa população de átrios bem maior.

Testamos também um novo protocolo de estimulação elétrica, baseado na aplicação não contínua dos pulsos estimulatórios. Tal protocolo (o chamado *trem triplo* ou *P3*) mostrou-se capaz de aumentar significativamente a indução de arritmia, comparado aos

protocolos com trens simples. Apesar de não termos conduzido experimentos para aprofundar a compreensão dos meios pelos quais P3 eleva IT, é provável que a aplicação dos 3 componente do trem, separados por breves intervalos, tenha aumentado a probabilidade do estímulo coincidir com o período vulnerável (i.e., período coincidente com a repolarização do tecido, durante o qual são altas a dispersão de refratariedade e a vulnerabilidade a indução de arritmias, Hume & Uehara, 1985; Feng *et al.*, 1998; Banville *et al.*, 1999), e da arritmia manifestar-se durante os intervalos. É possível, portanto, que outras versões de protocolos deste tipo (e.g., trens quádruplos, etc.) possam apresentar ainda maior eficiência para induzir arritmia. Tem sido demonstrado que, dependendo da fase do ciclo de atividade elétrica do tecido, um único estímulo pode ser capaz de disparar taquiarritmia sustentada (Boucher *et al.*, 1996; Kirchoff *et al.*, 1996; Laurita *et al.*, 1998; Banville *et al.*, 1999). É importante observar que, embora haja evidência de um forte componente colinérgico na indução de arritmia em nosso modelo experimental (Godoy *et al.*, 1999; presentes resultados), a estimulação elétrica *per se* parece ser de grande importância, haja vista que a estimulação a alta frequência não só aumenta a dispersão de refratariedade (Moe *et al.*, 1941), como também aumenta a excitabilidade do tecido cardíaco (Davidenko *et al.*, 1990). Portanto, é provável que a estimulação elétrica e a ativação muscarínica ajam sinergicamente, facilitando a iniciação e manutenção de circuitos reentrantes, característicos das taquiarritmias atriais.

A implicação prática do desenvolvimento de protocolos estimulatórios como P3 é que estes protocolos podem ser de grande utilidade em testes pré-clínicos de drogas potencialmente anti-arrítmicas.

## **5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO DA TAQUIARRITMIA ATRIAL INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA**

### **5.3.1 Efeito da estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos**

A influência dos receptores colinérgicos muscarínicos na indução de taquiarritmias foi alvo de estudos experimentais conduzidos por Godoy *et al.* (1999). Seus resultados permitiram a conclusão de que a ACh endógena é extremamente importante para a

ocorrência de taquiarritmia atrial *in vitro* por estimulação elétrica de alta frequência. Tal proposta baseou-se na observação de que a ocorrência deste tipo de arritmia era abolida após o tratamento com atropina (bloqueador de receptores muscarínicos colinérgicos), e era facilitada pela adição de ACh ao meio.

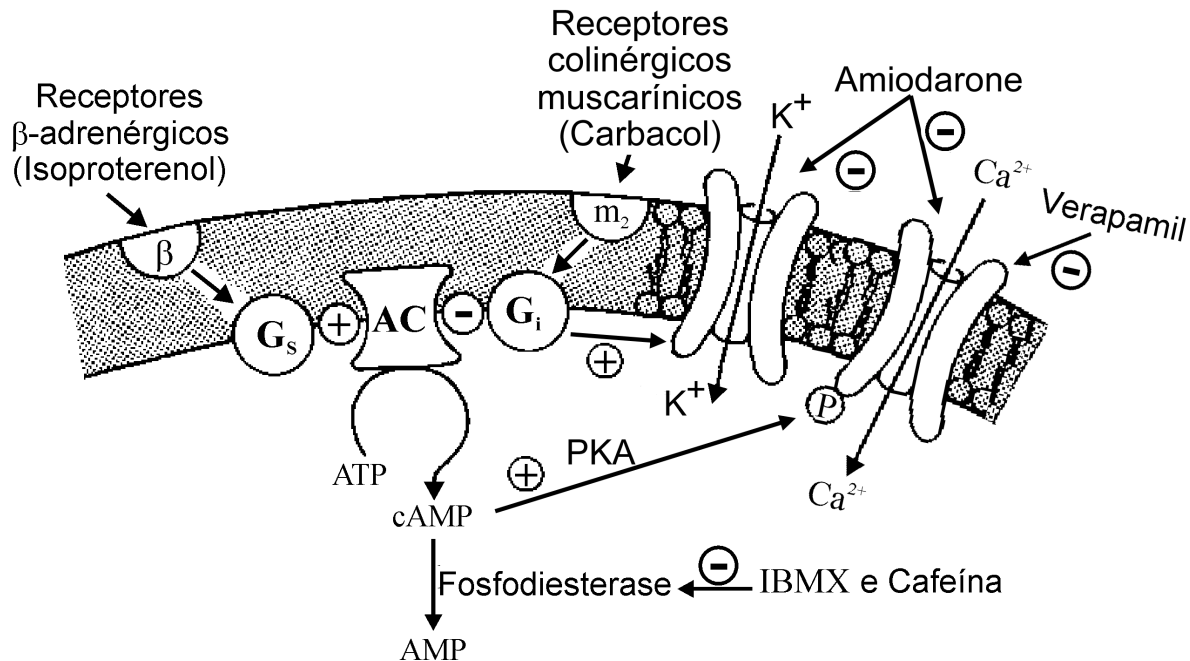
O presente trabalho confirmou os achados experimentais de Godoy *et al.* (1999), embora tenhamos utilizado CCh, ao invés de ACh. CCh foi preferido por ser resistente à degradação por colinesterases teciduais (Brown & Taylor, 1996), ao contrário do que ocorre com a ACh. Esta característica do CCh foi fundamental para os experimentos realizados neste trabalho, pois possibilitou ensaios experimentais mais longos. O sucesso na substituição da ACh pelo CCh é demonstrado pela enorme similaridade entre os nossos resultados e os obtidos por Godoy *et al.* (1999). Pudemos utilizar uma concentração mais baixa do agonista (0,6  $\mu\text{M}$  CCh vs. 1,0  $\mu\text{M}$  ACh), pois uma menor taxa de degradação está, em geral, associada à maior potência do agonista.

Consideremos agora os mecanismos celulares envolvidos com a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, e suas possíveis relações com a facilitação da ocorrência de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência.

No átrio de animais adultos, o efeito da ACh (e do CCh) está associado predominantemente à estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo  $m_2$  (Löffelholz & Pappano, 1985; Borda *et al.*, 1997; Opie, 1998). Propõe-se que os receptores  $m_2$  estejam acoplados a três vias de transdução bioquímica: a) uma proteína ligante de GTP (proteína G, no caso,  $G_i$ ) que exerce efeito inibitório sobre a adenilato-ciclase (AC), enzima esta que catalisa a formação do segundo mensageiro intracelular cAMP (Opie, 1998); b) a uma proteína G (como  $G_i$ , sensível a toxina pertússica) que medeia a ativação de canais de  $\text{K}^+$  específicos ( $I_{\text{K(ACh)}}$ ) (Löffelholz & Pappano, 1985; Kim, 1991; Watanabe *et al.*, 1996), e c) uma via que media a inibição da corrente de sódio ( $I_{\text{Na}}$ ), especialmente  $I_{\text{Na}}$  de fundo, proposta para células marca-passo atriais diretamente inervadas por terminações colinérgicas (Campbell *et al.*, 1989). As vias (a) e (b) estão representadas na **Figura 5.1**.

Como podemos observar nesta figura, a via da inibição da AC envolve a ativação da subunidade  $\alpha$  da proteína G acoplada ao receptor  $m_2$ , que ocorre em função da ocupação deste receptor pelo agonista, resultando em redução da taxa de síntese de cAMP. O cAMP ativa a enzima proteína quinase A, a qual fosforila diversos substratos, entre eles, canais de

$\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, presentes no sarcolema. A fosforilação destes canais causa um aumento da condutância da membrana ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Portanto, esta via de ativação colinérgica causa indiretamente inibição da atividade destes canais. Deve-se ressaltar que a  $I_{\text{Ca,L}}$  é uma corrente despolarizante, considerada de grande importância na determinação da duração do platô do PA cardíaco (Bers, 1991; Opie, 1998).



**Figura 5.1** – Principais vias bioquímicas às quais estão acoplados os receptores β-adrenérgicos (ativados por isoproterenol) e colinérgicos muscarínicos  $m_2$  (ativados por carbacol) em células miocárdicas atriais.  $G_s$  e  $G_i$  são proteínas ligantes de GTP associadas aos receptores β e  $m_2$ , respectivamente. Quando o receptor é ocupado pelo agonista, sua conformação espacial se altera, o que resulta na ativação GTPásica da respectiva proteína G. Concomitantemente, ocorre dissociação entre as subunidades α e βγ destas proteínas. A subunidade α de  $G_s$  estimula a atividade catalítica da enzima adenilato-ciclase (AC), enquanto que a subunidade α de  $G_i$  a inibe. AC quebra ATP, formando o segundo mensageiro cAMP. Este ativa uma família de proteínas-quinases (PKA), que fosforilam diversos substratos, entre eles os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana, aumentando sua condutância. Estes canais podem ser bloqueados por verapamil e amiodarone. O nível celular de cAMP depende da taxa de sua síntese por AC, e também da taxa de sua degradação pelas fosfodiesterases, que rompem com sua estrutura cíclica. Estas enzimas podem ser inibidas por IBMX e cafeína. As subunidades βγ de  $G_i$  (possivelmente) ativam diretamente um tipo de canal de  $\text{K}^+$  cuja atividade é dependente da estimulação muscarínica. Amiodarone parece atuar como bloqueador deste canal (modificado de Opie, 1998).

Foi proposto que a via de transdução de  $I_{K(ACh)}$ , por sua vez, envolve as subunidades  $\beta\gamma$  de uma proteína G, possivelmente  $G_i$  (não mostradas na Figura 5.1). Estas subunidades agiriam diretamente sobre canais de  $K^+$  operados por ACh e estimulariam sua abertura (Reuveny *et al.*, 1994), o que aceleraria a repolarização da membrana durante o PA. Tanto a redução indireta da condutância de membrana ao  $Ca^{2+}$ , quanto o aumento direto da condutância ao  $K^+$  contribuiriam para reduzir a duração do PA atrial e, portanto, do período refratário. Seria esperado ainda um efeito hiperpolarizante no repouso, devido à ativação  $I_{K(ACh)}$ , o que poderia explicar a queda de velocidade de condução do PA no tecido atrial, causada por ACh (Marques, 1989).

Além destes efeitos, deve-se considerar a distribuição não homogênea dos receptores muscarínicos no tecido atrial. É de se esperar que a densidade destes receptores seja maior próximo das terminações para-simpáticas que inervam o tecido. Se isto realmente ocorre, o resultado seria que os efeitos eletrofisiológicos dos agonistas muscarínicos apresentariam heterogeneidade espacial, o que tenderia a aumentar a dispersão de refratariedade no tecido, tornando-o mais vulnerável à ocorrência de circuitos reentrantes e, conseqüentemente, a taquiarritmias.

Como já foi observado por Godoy *et al.* (1999) neste modelo experimental, é essencial a combinação dos efeitos celulares produzidos pela ativação muscarínica e pela estimulação elétrica de alta frequência, dado que estes autores observaram que nem a estimulação elétrica na presença de atropina, nem a adição de ACh na ausência de estimulação elétrica foram capazes de induzir arritmia. No presente estudo, atropina reverteu o aumento de IT causado por CCh, mas não eliminou totalmente a indução de arritmia. Isto pode ter sido devido a bloqueio insuficiente dos receptores muscarínicos, mas é também possível que a estimulação "per se" seja capaz de induzir arritmia. Isto porque, em certas preparações, observamos que a aplicação de 1-5 pulsos pode induzir taquiarritmia, embora, neste caso, seja esperada uma estimulação praticamente nula das terminações para-simpáticas. A estimulação elétrica de alta frequência pode contribuir para o desenvolvimento de taquiarritmia, entre outras razões, por aumentar a dispersão de refratariedade (Laurita *et al.*, 1998; Banville *et al.*, 1999), por aumentar a excitabilidade do tecido (Moe *et al.*, 1941), ou simplesmente por promover excitação do tecido durante o período vulnerável (Frazier *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1988; Boucher *et al.*, 1996;

Kirchhof *et al.*, 1996; Godoy, 1990). Assim, o modelo experimental utilizado neste trabalho parece envolver uma combinação de fatores, não um mecanismo único.

### 5.3.2 Efeito da estimulação de receptores $\beta$ -adrenérgicos

Como verificaram Godoy *et al.* (1999), o bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos por propranolol não teve influência sobre a indução de taquiarritmia por estimulação elétrica. Isto levou à conclusão de que a NA, possivelmente liberada das terminações nervosas simpáticas atriais pela estimulação, não estaria envolvida na facilitação da indução de taquiarritmia atrial. Curiosamente, tem sido descrito um efeito arritmogênico da NA e um efeito anti-arrítmico da ACh em tecido ventricular (Priori *et al.*, 1993; Tovar & Jones, 1997). Portanto, neste estudo, procuramos explorar a possibilidade de antagonismo adrenérgico-colinérgico na indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência. Verificamos que, no átrio direito, a simulação da estimulação simpática (por adição de ISO ao meio) opõe-se ao efeito da estimulação para-simpática, embora, diferentemente do que ocorre no ventrículo, a estimulação simpática tenha apresentado efeito anti-arrítmico.

No coração, os efeitos cronotrópico e inotrópico de mediadores simpáticos ocorrem devido à ocupação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. O principal mecanismo de transdução bioquímica destes receptores consiste na ativação indireta da AC por meio da subunidade  $\alpha$  da proteína ligante de GTP do tipo  $G_s$ . Esta subunidade dissocia-se de  $G_s$  após quebra do GTP ligado a esta, em resposta à ocupação do receptor por um agonista. A ativação de AC promove o aumento dos níveis intracelulares de cAMP (vide **Figura 5.1**). Portanto, a taxa de síntese de cAMP é afetada de modo oposto pela estimulação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e muscarínicos (Opie, 1998; Xiao *et al.*, 1999).

Considerando que estes receptores devem seu antagonismo funcional à sua convergência para a mesma via de transdução (síntese de cAMP), e ainda considerando que os nossos resultados demonstraram um antagonismo entre a estimulação adrenérgica e colinérgica na indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica, levanta-se a questão: estariam os níveis celulares de cAMP envolvidos com os efeitos anti-arrítmico e arritmogênico, respectivamente, das estimulações  $\beta$ -adrenérgica e muscarínica?

Para responder a esta pergunta, testamos a influência da IBMX sobre IT. IBMX é agente químico que promove um aumento na concentração intracelular de cAMP por meio da inibição das fosfodiesterases (enzimas responsáveis pela degradação do cAMP). Os resultados, mostrando que a IBMX tem um efeito anti-arrítmico semelhante ao do ISO, indicam que a concentração intracelular de cAMP parece estar envolvida nos efeitos antagônicos do ISO e da CCh sobre IT, e pode ser importante na determinação da vulnerabilidade do tecido atrial à ocorrência de taquiarritmias. Os efetores celulares indiretos do cAMP (i.e., os substratos que, quando fosforilados pela PKA, conferem resistência à indução de arritmia), neste caso, não são conhecidos. Uma possibilidade seria o envolvimento dos canais de  $Ca^{2+}$  do tipo L, presentes no sarcolema (Bers, 1991). O aumento da probabilidade de abertura destes canais, conferido pela fosforilação pela PKA, poderia prolongar o PA (e, portanto, o período refratário). Por outro lado, a redução do nível celular de cAMP pelo CCh poderia reduzir a corrente através destes canais, o que contribuiria para encurtamento do PA. No entanto, não dispomos de dados consistentes na literatura que indiquem aumento da duração do PA por estimulação  $\beta$ -adrenérgica, ou reversão, por esta via, do encurtamento de PA causado por estimulação muscarínica. Portanto, este ponto requer esclarecimento em estudos futuros.

Uma observação intrigante deve ser ressaltada: embora a estimulação  $\beta$ -adrenérgica com ISO fosse capaz de suprimir a ocorrência de arritmias que provavelmente envolviam a liberação de ACh endógena, ela não foi efetiva para reverter o efeito arritmogênico da CCh exógena. Atenuação deste efeito só foi observado em concentrações bem maiores de ISO (acima de 50 nM). Isto poderia ser devido a:

- a) Diferentes graus de estimulação e inibição da AC por ISO e CCh, respectivamente, nas concentrações utilizadas (0,6  $\mu$ M e 10 nM, respectivamente). O efeito redutor de IT do ISO em concentrações mais altas está de acordo com esta possibilidade; e/ou
- b) Envolvimento de outro(s) mecanismo(s) celular(es) no efeito do CCh, além da diminuição na concentração intracelular de cAMP, (por exemplo, ativação de  $I_{K(ACh)}$ ).

É importante observar que, diferente do ocorrido com ISO, IBMX inibiu o efeito arritmogênico do CCh. No entanto, por apresentar um efeito de lenta instalação, IBMX



requer um longo período de estabilização ( $\pm 30$ min), durante o qual o CCh permaneceu presente no banho. Neste período, degradação significativa do CCh pode ter ocorrido, ou, ainda, pode ter-se instalado dessensitização da via muscarínica (i.e., perda de resposta por contato prolongado dos receptores com o fármaco). São necessários experimentos complementares para esclarecer este ponto.

### **5.3.3 Análise de outros mecanismos celulares relevantes à indução de taquiarritmia: efeito de agentes anti-arrítmicos**

O VERA é um fármaco extensamente usado na clínica médica para tratamento de taquiarritmias (Ukani & Ezekowitz, 1995; Roden, 1996, Prystowsky *et al.*, 1996). Seu efeito anti-arrítmico é atribuído fundamentalmente ao bloqueio de canais de cálcio tipo L do sarcolema (Roden, 1996). Em nosso modelo experimental, testamos o VERA procurando verificar seu efeito sobre IT, quando aplicado isoladamente e após adição de CCh. Verificamos que o VERA reduziu a frequência atrial espontânea e, em algumas preparações, aboliu o eletrograma, apesar da baixa concentração utilizada (1  $\mu$ M). Isto está de acordo com seu efeito bloqueador de canais de cálcio, uma vez que a corrente devida a tal canal é muito importante para a modulação da função do nódulo SA (Opie, 1998) e para a condução da atividade elétrica no miocárdio (Rohr *et al.*, 1998). No entanto, não temos base experimental que nos permita concluir se este efeito do VERA deve-se à supressão do automatismo sinusal, ou o bloqueio de condução do PA no tecido atrial.

Quando aplicado isoladamente, o VERA suprimiu a ocorrência de taquiarritmia quase completamente, o que poderia ser atribuído ao seu efeito depressor da condução da atividade elétrica, o que seria esperado dificultar a manutenção de circuitos reentrantes. Tal efeito anti-arrítmico do VERA foi revertido pela aplicação subsequente de CCh ao meio, o que sugere que este fármaco evoca, no tecido, um efeito não bloqueável pelo VERA. Isto foi confirmado pela ausência de efeito do VERA sobre IT quando aplicado em preparações já expostas a CCh. Como previamente observado com ISO (embora tendo diferentes mecanismos de ação), VERA foi, portanto, capaz de inibir a indução de taquiarritmia supostamente facilitada pela liberação de ACh endógena, mas não quando facilitada por CCh exógeno. Isto levanta as possibilidades (não mutuamente exclusivas) de que: a) a concentração de ACh na biofase seja menor do que aquela de CCh adicionado ao banho, o

que poderia explicar os efeitos mais resistentes deste; b) a ACh liberada neuralmente tivesse uma ação menos duradoura do que o CCh, o que parece ocorrer, pois o último não é um bom substrato para as colinesterases (Brown & Taylor, 1996); c) populações diferentes de receptores muscarínicos e/ou diferentes vias bioquímicas seriam ativadas pelos dois agonistas. Campbell *et al.* (1989) propuseram a ativação de diferentes mecanismos celulares relacionados com receptores muscarínicos juncionais (i.e., ativados pela ACh de origem vagal) e extra-juncionais (i.e., também ativados pela adição de agonistas ao banho) no nódulo SA.

É curioso, no entanto, observar, que ambos CCh e VERA deveriam causar encurtamento do PA. Porém, seus efeitos sobre IT são diametralmente opostos. Isto indica que a redução da duração do PA *per se* poderia ser insuficiente para explicar o efeito arritmogênico da estimulação muscarínica. Por exemplo, esta redução, para ser arritmogênica, deveria ocorrer com heterogeneidade espacial. No entanto, é difícil separar os efeitos sobre refratariedade e velocidade de condução. Um estudo com mapeamento da atividade elétrica em diferentes regiões do átrio poderia esclarecer este ponto.

O AMI também é largamente usado na clínica médica para tratamento de arritmias atriais. Na verdade, em muitos casos AMI é preferido ao VERA por atuar sobre uma variedade maior de arritmias atriais e por produzir resultados mais duradouros (Ukani & Ezekowitz, 1995; Roden, 1996, Prystowsky *et al.*, 1996). Entre os mecanismos celulares envolvidos com o efeito anti-arrítmico do AMI, encontra-se o bloqueio de canais de cálcio de membrana (Ukani & Ezekowitz, 1995; Roden, 1996). Se este mecanismo fosse o principal na determinação de seu efeito anti-arrítmico, AMI deveria, assim como VERA, reduzir IT na ausência, mas não na presença de CCh exógeno.

AMI, assim como VERA, reduziu a frequência espontânea atrial, como seria esperado de um agente bloqueador de canais de cálcio. Nossos resultados mostram ainda que AMI reduziu IT quando aplicado isoladamente, o que também foi verificado com VERA. Porém, diferentemente do que ocorreu com VERA e com ISO, AMI reduziu IT também quando aplicado após a adição de CCh. Isto levanta a possibilidade de que o AMI possa exercer seu efeito anti-arrítmico por outros mecanismos, além do bloqueio de canais de cálcio.

Watanabe *et al.* (1996) estudaram o efeito do AMI em miócitos atriais de cobaias. Estes autores observaram que CCh e adenosina causavam abreviação do PA, de forma dependente da concentração. AMI, na faixa de concentração utilizada no presente estudo, reverteu o efeito de ambos os agonistas sobre a duração do PA. Os autores demonstraram que este efeito era associado ao bloqueio, por AMI, de  $I_{K(ACh)}$ , estimulada por CCh e adenosina. Como já exposto, esta corrente é gerada por saída de cátions, sendo, portanto, uma corrente repolarizante, que tende a diminuir a duração do PA. Uma observação importante de Watanabe *et al.* (1996) foi que o efeito de AMI não foi inibido pelo bloqueio de receptores muscarínicos por atropina, evidenciando, assim, uma ação direta do AMI sobre os canais de potássio dependentes de ACh.

Outros fármacos aqui estudados, que, isoladamente, reduziram IT, como o ISO e VERA, perdiam seu efeito anti-arrítmico se aplicados após CCh, o que nos levou a supor a existência de outros mecanismos relevantes à indução de taquiarritmias por CCh, que não seriam afetados por ISO ou VERA. AMI foi o único agente capaz de reduzir IT tanto isoladamente, quanto após facilitação da arritmogênese por CCh. Seu efeito bloqueador de  $I_{K(ACh)}$ , (Watanabe *et al.*, 1996) sugere que este mecanismo adicional seja a redução da duração do período refratário (aumentando a dispersão de refrateriedade no tecido), causada pela aceleração da fase de repolarização do PA. No entanto, esta proposta requer estudos eletrofisiológicos mais detalhados para sua confirmação. Vale a pena mencionar que taquiarritmias atriais de origem colinérgica também são frequentes em humanos (especialmente indivíduos jovens do sexo masculino), em geral associadas a aumento do tônus para-simpático, como durante a noite, o repouso e no período pós-prandial (Prystowsky *et al.*, 1996). É intrigante que AMI, o único dos agentes anti-arrítmicos mais comuns a bloquear  $I_{K(ACh)}$ , é também considerado, em geral, o agente terapêutico mais efetivo para fibrilação (Prystowsky *et al.*, 1996).

Wang *et al.* (1997) observaram em miócitos atriais de gato que a aplicação de ACh, além de apresentar o efeito inotrópico negativo clássico, causava um forte inotropismo positivo após sua retirada do meio (efeito-rebote). Estes autores demonstram que este efeito-rebote é mediado pela síntese de NO, estimulada por ACh (Wang *et al.*, 1998). NO apresenta ação vasodilatadora, e é produzido principalmente pelo endotélio vascular em

resposta à estimulação muscarínica e purinérgica (Opie et al. 1998). Hoje, sabe-se que o NO está envolvido na cascata bioquímica de sinalização muscarínica em diversos tecidos (Randall, 1997). Para investigar um possível envolvimento do NO no efeito pró-arrítmico muscarínico, testamos se L-Arg, assim como ACh e CCh, também facilitava a indução de taquiarritmias por estimulação elétrica. L-Arg é um substrato para a NO-sintase endógena, e, no coração, sua adição, em concentrações milimolares, leva ao aumento da síntese de NO e mimetiza a ativação colinérgica (Wang et al., 1998; Choate & Paterson, 1999; Conlon & Kidd, 1999).

Observamos que L-Arg, assim como CCh, reduziu a frequência atrial. No entanto, na presença de L-Arg, a indução de arritmia foi virtualmente abolida. Embora Choate & Patterson (1999) tenham observado que L-Arg, assim como ACh e CCh, é capaz de atenuar os efeitos da estimulação adrenérgica em tecido atrial de cobaia, Nawrath *et al.* (1995) relataram que o NO parece não ter efeito direto em tecido atrial de rato, coelho, cobaia, rã e humano. Tem sido proposto que a facilitação por NO sobre efeitos da estimulação vagal no coração envolvam síntese de NO pelas terminações nervosas colinérgicas, mas não pelo tecido atrial (Conlon & Kidd, 1999).

É possível que, nas altas concentrações administradas (3-5 mM), L-Arg tenha apresentado algum efeito deletério para a preparação (mesmo tendo tido o cuidado de proceder à correção da alcalinização resultante da adição de L-Arg). Outra possibilidade, que explicaria a inibição da indução de taquiarritmias, seria um acentuado efeito dromotrópico negativo, equivalente a forte estimulação colinérgica (Marques, 1989; Conlon & Kidd, 1999), causando bloqueio da condução da atividade elétrica atrial. Outra possibilidade, mais intrigante, é a inibição de fosfodiesterases por cGMP, desencadeada pela produção de NO, como proposto por Wang *et al.* (1998). Este mecanismo levaria a um aumento do nível intracelular de cAMP, mimetizando a estimulação  $\beta$ -adrenérgica e o efeito da IBMX. Curiosamente, tanto ISO e IBMX, quanto L-Arg, inibiram a indução de arritmia em nosso modelo experimental. De qualquer forma, nossos resultados, por seu caráter preliminar, não permitem concluir efetivamente sobre a participação do NO na gênese de taquiarritmias induzidas por estimulação elétrica. Portanto, mais estudos fazem-se necessários para esclarecer esta questão específica.

Em suma, neste trabalho pudemos concluir que a indução *in vitro* de taquiarritmia por estimulação elétrica do tecido atrial apresenta um antagonismo entre os mecanismos efetores  $\beta$ -adrenérgico e colinérgico muscarínico, provavelmente no controle da taxa de síntese de cAMP. No entanto, o efeito pró-arrítmico da estimulação muscarínica (especialmente realizada por adição de CCh ao meio) parece ser complexo, envolvendo mais de um mecanismo celular. Nossos resultados sugerem que um destes mecanismos, aparentemente de grande importância na determinação deste efeito, parece ser a ativação da corrente de potássio acoplada a receptores muscarínicos. Esta corrente, acelerando a fase de repolarização do PA, abreviaria o período refratário apenas nas células-alvo do agonista muscarínico, levando a dispersão de refratariedade. É interessante observar que fármacos que promovem a abertura de outros tipos de canais de potássio (como aqueles regulados por ATP) têm sido relatados como causadores de arritmias em tecido cardíaco (Grover, 1997). Por fim, ao examinar 2 agentes amplamente utilizados na clínica cardiológica para tratamento de taquiarritmias atriais (VERA e AMI), pudemos observar que ambos inibem a indução de arritmia em nosso modelo experimental, o que demonstra seu valor terapêutico também para arritmias de origem colinérgica.

As conclusões que podemos tirar dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho são:

- (a) As estimulações adrenérgicas e colinérgicas se antagonizam relativamente a facilitação de indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica de alta frequência, este antagonismo parece envolver o controle dos níveis intracelulares de cAMP, e a atividade de canais de cálcio tipo L;
- (b) Além disso, a ativação de canais de potássio dependentes de ACh parece ser um mecanismo utilizado para facilitar a ocorrência de taquiarritmia atrial.

## **Capítulo 6**

### **Referências Bibliográficas**

- Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke IM & Hollen J. Intra-atrial reentry as a mechanism for atrial flutter induced by acetylcholine and rapid pacing in the dog. *Circulation*, 70: 123-135, 1984.
- Banville I, Gray RA, Ideker RE & Smith WM. Shock-induced figure-of-eight reentry in the isolated rabbit heart. *Circ. Res.*, 85: 742-752, 1999.
- Bassani JWM & Moraes S. *Effects of repeated footshock stress on the chronotropic responsiveness of the isolated pacemaker of the rat: role of beta-2 adrenoceptors*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 316-321, 1988.
- Bassani RA & Bassani JWM. Reduced responsiveness to noradrenaline in isolated rat exposed to hyperosmotic solutions. *Gen. Pharmacol.*, 22: 151-157, 1991.
- Berne RM & Levy MN. O sistema cardiovascular. Em: *Fisiologia*. Berne RM. & Levy MN. (eds.). 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996, p. 341-510.
- Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. p. 258.
- Bethke T, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Stein B, Thomas K & Wenzlaff H. Phosphodiesterase inhibition in ventricular cardiomyocytes from guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 127-133, 1992.
- Blaustein AS & Walsh RA. Regulation of the cardiovascular system. In: *Physiology*. N. Sperelakis & R.O. Banks (eds.). Boston, Little ,Brown and Co., 1993. p. 351-372.
- Borda ES, Leiros CP, Camusso JJ, Bacman S & Sterin-Borda LS. Differential cholinergic subtype-dependent activation of signal transduction pathways in neonatal versus adult rat atria. *Biochem. Pharmacol.*, 53: 959-967, 1997.

- Boucher M, Chassaing C, Chapuy E & Lorente P. Hysteresis in atrial refractoriness in the conscious dog: influence of stimulation parameters and control by the autonomic nervous system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 28: 842-847, 1996.
- Brown JH & Taylor P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. *In: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW & Goodman-Gilman A (eds.). 9<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 1996, p. 141-160.
- Campbell G, Edwards F, Hirst G & O'Shea J. Effects of vagal stimulation and applied acetylcholine on pacemaker potentials in the guinea-pig heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 415: 57-68, 1989.
- Choate JK & Paterson DJ. Nitric oxide inhibits the positive chronotropic and inotropic responses to sympathetic nerve stimulation in the isolated guinea-pig atria. *J Auton Nervous System*, 75: 100-108, 1999.
- Conlon K, Kidd C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic action on the heart. *J Auton Nervous System*, 75: 136-146, 1999.
- Davidenko JM, Levi RJ, Maid G, Elizari V & Rosenbaum MB. Rate dependence and supernormality in excitability of guinea pig papillary muscle. *Am. J. Physiol.*, 259: H290-H299, 1990.
- Demir SS, Clark JW & Giles WR. Parasympathetic modulation of sinoatrial node pacemaker activity in rabbit heart: a unifying model. *Am. J. Physiol.*, 45: H2221-H2244, 1999.
- Endoh M. Muscarinic regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian atrial and ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.*, 375: 177-196, 1999.



- Euler DE & Scanlon PJ. Acetylcholine release by a stimulus train lowers atrial fibrillation threshold. *Am. J. Physiol.*, 253:H863-H868, 1987.
- Euler DE, Olshansky B & Kim SY. Reflex vagal control of atrial repolarization. *Am. J. Physiol.* 271: H870-H875, 1996.
- Feng J, Yue L, Wang Z & Nattel S. Ionic mechanisms of action potential heterogeneity in the canine atrium. *Circ. Res.*, 83: 541-551, 1998.
- Frazier DW, Wolf PD, Wharton JM, Tang ASL, Smith WM & Ideker RE. Stimulus-induced critical point. *J Clin Invest*, 83: 1039-1052, 1989.
- Godoy CMG. *Sistema para estimulação cardíaca programada*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, 1990, p. 45.
- Godoy CMG, Bassani RA & Bassani JWM. Role of acetylcholine in electrical stimulation-induced arrhythmia in rat isolated atria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 34: 475-479, 1999.
- Granner DK. Hormônios do Pâncreas. Em: *Harper: Bioquímica*. Harper RM (ed.). 6<sup>a</sup> ed. São Paulo, Atheneu , 1990, p. 568.
- Guyton, AC. Coração. Em: *Fisiologia Humana*. Guyton, AC (ed). 6<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1988. p. 128-176.
- Hayes JS, Wyss VL, Schenck KS & Cohen ML. Effects of prolonged isoproterenol infusion on cardiac and vascular responses to adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237: 757-763, 1986.

- Hirose M, Furukawa Y, Nagashima Y, Yamazaki K, Hoyano Y & Chiba S. Effects of PACAP-38 on the AS nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 29: 216-221, 1997.
- Hoffman BB & Lefkowitz RJ. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. *In: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW & Goodman-Gilman A (eds.). 9<sup>a</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 1996, p. 199-248.
- Hoffman BF & Suckling EE. Cardiac cellular potentials: effect of vagal stimulation and acetylcholine. *Am. J. Physiol.*, 173: 312-20, 1953.
- Hoffman BF & Rosen MR. Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circ. Res.*, 49: 1-15, 1981.
- Hoit BD & Walsh RA. Determinants of left ventricular performance and cardiac output. *In: Physiology*. N. Sperelakis & R.O. Banks (eds.). Boston, Little , Brown and Co., 1993. p. 289-302.
- Hume JR & Uehara A. Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 368: 525-544, 1985.
- Josephson IR & Sperelakis N. Initiation and propagation of the cardiac action potential. *In: Physiology*. N. Sperelakis & R.O. Banks (eds.). Boston, Little , Brown and Co., 1993. p. 251-269.
- Jurevicius J & Fishmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca<sup>+2</sup> channels by  $\beta$ -adrenergic agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 295-299, 1996.

- Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ & Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing condition for atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.*, 82: 2N-9N, 1998.
- Kim D. Modulation of acetylcholine-activated K<sup>+</sup> channel function in rat atrial cells by phosphorylation. *J. Physiol. (Lond.)*, 437:133-155, 1991.
- Kirchoff PF, Fabritz CL, Zabel M & Franz MR. The vulnerable period for low and high energy T-wave shocks: role of dispersion of repolarisation and effect of d-sotalol. *Cardiovasc. Res.*, 31: 953-962, 1996.
- Laurita KR, Girouard SD, Akar FG & Rosenbaum DS. Modulated dispersion explains changes in arrhythmia vulnerability during premature stimulation of the heart. *Circulation*, 98: 2774-2780, 1998.
- Lin HJ, Wolf PA, Hayes MK, Beiser AS, Kase CS, Benjamin EJ & D'Agostino RB. Stroke severity in atrial fibrillation - the Framingham study. *Stroke*, 27: 1760-1764, 1996.
- Löffelholz K & Pappano AJ. The parasympathetic neuroeffector junction in the heart. *Pharmacol. Rev.*, 37: 1-24, 1985.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O & Jalife J. Stable microreentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in isolated sheep heart. *Circulation*, 101: 194-199, 1999.
- Marques JLB. *Metodologia e instrumentação para determinação do tempo de recuperação do nóculo sinusal in vitro*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, 1989, p. 70.
- Mayes PA. Metabolismo do Glicogênio. *Em: Harper: Bioquímica*. Harper RM (ed.). 6<sup>a</sup> ed. São Paulo, Atheneu, 1990, p. 174-175.

- Minamino T, Kitakase M, Asanuma H, Ueda Y, Koretsune Y, Kuzuya T & Hori M. Plasma adenosine levels and platelet activation in patients with atrial fibrillation. *Am. J. Cardiol.*, 83: 194-198, 1999.
- Moe GK, Harris AS & Wiggers CJ. Analysis of the initiation of fibrillation by electrographic studies. *Am. J. Physiol.*, 134: 473-492, 1941.
- Nawrath H, Bäummer D, Rupp J & Oelert H. The ineffectiveness of the NO-cyclic signaling pathway in the atrial myocardium. *Brit. J. Pharmacol.*, 116: 3061-3067, 1995.
- Netter FH. *The Ciba Collection of Medical Illustrations: Heart*. 4a ed. Summit. EUA. Ciba, 1978. 5v.
- Opie LH. *The Heart: Physiology from Cell to Circulation*. 3<sup>o</sup> ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publ., 1998. p. 637.
- Priori SG, Napolitano C & Schwartz PJ. Cardiac receptor activation and arrhythmogenesis. *Eur. Heart. J.*, 14: 20-26, 1993.
- Prystowsky EN, Benson, Jr, DW, Fuster V, Hart RG, Kay GN, Myerburg RJ, Naccarelli GV & Wyse DG. Management of patients with atrial fibrillation. *Circulation*, 93:1262-1277, 1996.
- Randall DJ, Burggren W & French K. *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptation*. 4<sup>o</sup> ed. New York. W. H. Freeman Co., 1997.
- Reuveny EP, Slesinger P, Inglese J, Morales J, Iniguezllhi J, Lefkowitz R, Bourne H, Jan Y & Jan L. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature*, 370: 143-146, 1994.

- Roden DM. Antiarrhythmic drugs. *In: The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW & Goodman-Gilman A (eds.). 9<sup>a</sup> ed. New York, McGraw-Hill, 1996, p. 839-874.
- Rohr S, Kucera JP & Kleber AG. Slow conduction in cardiac tissue. I. Effects of a reduction of excitability versus a reduction of electrical coupling on microconduction. *Circ. Res.*, 83: 781-794, 1998.
- Seidl K, Hauer B, Schwick NG, Zellner D, Zahn R & Senges J. Risk of thromboembolic events in patients with atrial flutter. *Am. J. Cardiol.*, 82: 580-583, 1998.
- Shibata N, Chen PS, Dixon EG, Wolf PD, Daniele ND, Smith WM & Ideker RE. Influence of shock strength and timing on induction of ventricular arrhythmias in dogs. *Am. J. Physiol.* 255 (*Heart. Circ. Physiol.*, 24): H891-H901, 1988.
- Tovar OH & Jones JL. Epinephrine facilitates cardiac fibrillation by shortening action potential refractoriness. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29: 1447-1455, 1997.
- Ukani ZU & Ezekowitz MD. Contemporary management of atrial fibrillation. *Med. Clin. North America*, 79: 1135-1152, 1995.
- Vaidya D, Morley GE, Samie FH & Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart. *Circ. Res.* 85:174-181, 1999.
- Walsh RA. Basic principles of cardiovascular physiology. *In: Physiology.* N. Sperelakis & R.O. Banks (eds.). Boston, Little, Brown and Co., 1993. p. 245-250.
- Wang YG, Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL. Withdrawal of acetylcholine elicits Ca<sup>2+</sup>-induced delayed afterdepolarizations in cat atrial myocytes. *Circulation*, 96: 1275–1281, 1997.

Wang YG, Rechenmacher CE & Lipsius SL. Nitric oxide signaling mediates stimulation of L-type  $\text{Ca}^{+2}$  current elicited by withdrawal of acetylcholine in cat atrial myocytes. *J. Gen. Physiol.*, 111: 113-125, 1998.

Watanabe Y, Hara Y, Tamagawa M & Nakaya H. Inhibitory effect of amiodarone on the muscarinic acetylcholine receptor-operated potassium current in guinea pig atrial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279: 617-624, 1996.

Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, Kuschel M & Lakatta EG. Recent advances in cardiac  $\beta_2$ -adrenergic signal transduction. *Circ. Res.*, 85: 1092-1100, 1999.