

305
JOSÉ WILSON MAGALHÃES BASSANI

Este exemplar corresponde
à redação final da tese de
Doutoramento defendida por
José Wilson Magalhães Bassani
e aprovada pela comissão julgadora
em 14 de abril de 1987
W. Bassani - Ed. - Ed.

" CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA
DO EFEITO DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE NaCl
SOBRE A FORÇA CONTRÁTIL DO TECIDO CARDÍACO
ISOLADO DE RATO "

Tese apresentada ao Departamento
de Engenharia Elétrica da Faculdade
de Engenharia Elétrica da UNICAMP,
para obtenção do grau de Doutor em
Engenharia Elétrica, área de automação
(Engenharia Biomédica)

CAMPINAS - 1987

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em laboratório de pesquisa sob responsabilidade da profa. Dra. Marina Queiroz do Amaral Turrin. *MT*

O desenvolvimento de instrumentação e o processamento dos dados foram realizados no Centro de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Maurício da Rocha e Silva, pela valiosa orientação, pelas críticas e sugestões e pelo empenho na viabilização do presente trabalho.

A profa. Dra. Marina Queiroz do Amaral Turrin, pela acolhida ao seu laboratório, permitindo, o acesso a todos os recursos disponíveis, pelas críticas e sugestões, e pelo apoio na montagem da preparação biológica.

Ao prof. Dr. Sergio de Moraes, pela cessão de material e equipamentos de seu laboratório, bem como pelas sugestões quanto ao emprego de fármacos para bloqueio de receptores adrenérgicos e colinérgicos.

A Rosana Almada Bassani, pelas inúmeras críticas e sugestões, durante todas as fases de elaboração deste trabalho, em especial pela orientação no tratamento estatístico dos dados e no emprego de técnicas laboratoriais.

Ao prof. Eduardo Tavares Costa, pelo constante apoio e pela participação efetiva na construção do Disparador Programável, instrumento imprescindível à realização deste trabalho.

A profa. Dra. Maria Adélia Collier Farias, pela orientação de programa junto ao curso de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica da UNICAMP.

Ao prof. Dr. Wang Binseng, pelo auxílio na escolha da área de trabalho e pela cessão de equipamentos que facilitaram a obtenção dos dados experimentais.

A Esther Gimenez Rezzetti e ao José Pereira Simões Neto, pelas competentes colaborações como técnicos de laboratório.

A Luiza Maria de Campos e ao Mauro Sérgio Martinazo, pelo excelente trabalho de confecção dos desenhos.

A Tereza Cristina Soultto Mayor, pelo auxílio extremamente eficiente como bibliotecária do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

A Coordenação dos Cursos de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro concedido durante os meses de setembro a outubro de 1983.

A todos os funcionários e alunos do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Para

Rosana e Mariana.

RESUMO

Soluções hiperosmóticas (SH) de NaCl vem sendo utilizadas, com sucesso, no tratamento do choque hemorrágico, em substituição à transfusão sanguínea. No presente trabalho, estudou-se o efeito de tais soluções sobre a força contrátil do tecido cardíaco isolado de rato, estimulado eletricamente, em regime de contração isométrica. O objetivo principal foi caracterizar qualitativa e quantitativamente o efeito inotrópico das soluções de NaCl, procurando identificar fatores envolvidos em sua gênese. Para isto, realizou-se análise de variância trifatorial envolvendo solutos (NaCl e sacarose), doses (incrementos de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade do líquido de incubação) e frequências estimulatórias (4, 16 e 64 est./min.) para diversos parâmetros (T_{max} , tT_{max} , tD e dT/dt) do abalo contrátil, estudou-se comparativamente o curso temporal do efeito inotrópico de soluções hiperosmóticas de NaCl, sacarose e cloreto de colina, na ausência e na presença de bloqueio de receptores adrenérgicos e colinérgicos muscarínicos e, finalmente, determinou-se a influência da hiperosmolalidade sobre a estequiometria da troca Na^+/Ca^{++} , fator de grande importância para a gênese de tensão no músculo cardíaco. Dos resultados obtidos foram tiradas as seguintes conclusões: a) O efeito inotrópico das SH de NaCl é altamente complexo envolvendo a dependência da frequência, da osmolalidade e do tempo; b) As SH de NaCl podem produzir efeito inotrópico negativo ou positivo, dependendo da frequência estimulatória e da osmolalidade da solução, em contração ao efeito inotrópico sempre positivo das SH de sacarose, nas mesmas faixas de frequência e osmolalidade; c) As SH de NaCl produzem, inicialmente, rápida e potente redução (de até 50% do valor inicial), seguida de uma fase de recuperação, na tensão máxima desenvolvida (T_{max}) pelo tecido cardíaco. A redução inicial de T_{max} é causada pelo aumento da concentração de íons Na^+ no líquido de incubação. A fase de recuperação, por sua vez, tem sua ocorrência condicionada ao incremento de osmolalidade produzido pela aplicação das SH de NaCl e; d) A hiperosmolalidade reduz a estequiometria da troca Na^+/Ca^{++} , o que corresponde a uma redução no número de íons Na^+ para cada íon Ca^{++} , transportado através das células cardíacas da preparação estudada.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 ANIMAIS.....	17
3.2 PRODUTOS QUÍMICOS.....	17
3.3 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS.....	17
3.4 INSTRUMENTAÇÃO.....	22
3.5 PREPARAÇÃO BIOLÓGICA.....	25
3.6 CAPTAÇÃO, REGISTRO E MEDIÇÃO DA FORÇA CONTRÁTIL.....	27
3.7 PERÍODO DE ESTABILIZAÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DO TECIDO CARDÍACO.....	31
3.8 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	33
3.9 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	40
4. RESULTADOS	
4.1 ANÁLISE TRIFATORIAL DO EFEITO DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE NaCl E DE SACAROSE SOBRE A FORÇA CONTRÁTIL DO TECIDO AURICULAR ESQUERDO ISOLADO DE RATO....	42
4.2 RELAÇÃO FORÇA-FREQUÊNCIA EM TECIDO AURICULAR ESQUERDO ISOLADO DE RATO, NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS	

DE NaCl E DE SACAROSE.....	67
4.3 CURSO TEMPORAL DO EFEITO DAS SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS SOBRE T _{max}	86
4.4 ESTEQUIOMETRIA DA TROCA Na ⁺ /Ca ⁺⁺ NO TECIDO CARDÍACO ISOLADO DE RATO EM MEIO ISO E HIPEROSMÓTICO.....	110
5. DISCUSSÃO	
5.1 ANÁLISE TRIFATORIAL DO EFEITO DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS SOBRE O TECIDO CARDÍACO ISOLADO DE RATO.....	114
5.2 RELAÇÃO FORÇA-FREQUÊNCIA EM TECIDO ATRIAL ESQUERDO ISOLADO DE RATO, NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS....	117
5.3 CURSO TEMPORAL DO EFEITO DE SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS EM TECIDO AURICULAR ESQUERDO ISOLADO DE RATO.....	122
5.4 ESTEQUIOMETRIA DA TROCA Na ⁺ /Ca ⁺⁺ EM TECIDO CARDÍACO ISOLADO DE RATO.....	126
6. CONCLUSÕES.....	130
7. BIBLIOGRAFIA.....	132

APENDICE: DISPARADOR PROGRAMÁVEL DP 1.1

1. INTRODUÇÃO

A água é o componente mais abundante no organismo humano, constituindo cerca de 70% do peso corporal (Manery, 1954; Pitts, 1974) e compondo os chamados líquidos orgânicos num volume de aproximadamente 45 litros. Este volume total está dividido em dois grandes compartimentos, o intra e o extracelular, e em outro bem menor, chamado de transcelular. Este último inclui os líquidos da árvore traqueobronquial, o fluido cerebroespinhal e o humor aquoso do olho (Macknight & Leaf, 1977; Lassiter & Gottschalk, 1978; Mudge, 1980).

Cerca de 55% da água total do organismo encontra-se no interior das células e compõe o denominado fluido intracelular. Este fluido tem constituição semelhante nas diversas células e por essa razão considera-se o conjunto dos trilhões de células do organismo como um grande compartimento, o intracelular (Lassiter & Gottschalk, 1978).

No chamado compartimento extracelular, encontram-se o líquido que se situa nos espaços entre as células (líquido intersticial) e a parte não celular do sangue, o plasma. Estes fluidos que compõe o fluido extracelular estão em comunicação através da extensa rede de capilares do sistema circulatório (Guyton, 1973; Lassiter & Gottschalk, 1978).

Há grandes diferenças entre as composições dos fluidos dos

compartimentos intra e extracelular. Verifica-se, por exemplo, que no fluido intracelular há predominância de íons potássio enquanto que no extracelular, sódio e clóreto são os íons presentes em maior concentração. A manutenção desta concentração eletrolítica é possibilitada pela participação de um sofisticado mecanismo de transporte iônico, o transporte ativo de sódio-potássio (bomba de sódio), que, a custo do gasto de energia metabólica, mantém elevadas as concentrações intracelular de potássio e extracelular de sódio. Este mecanismo, além de manter os gradientes de concentração que constituem os substratos para o processo de excitação e condução nas células excitáveis, é também parcialmente responsável pela regulação do volume celular (Mudge, 1980).

O principal determinante da passagem de fluidos de um compartimento para o outro no organismo é, contudo, o gradiente de pressão osmótica: sempre que uma membrana separadora de dois compartimentos líquidos for permeável ao solvente, mas impermeável a alguns solutos nele dissolvidos (membrana semi-permeável), e a concentração de substâncias não difusíveis for maior em um dos lados da membrana, haverá fluxo de volume em direção ao lado de maior concentração. Este fenômeno, resultante da energia cinética das moléculas em ambos os lados da membrana, denomina-se osmose. Em sentido estrito osmose significa transferência de água e outros elementos através de uma membrana. A pressão hidrostática necessária para equilibrar a osmose é denominada de pressão osmótica (Pitts, 1974; Hildebrand, 1979).

A capacidade dos solutos em provocar osmose é medida em os-

móis. Uma molécula grama de substância não difusível e não ionizável em solução é igual a 1 osmol. A atividade osmótica das substâncias no organismo costuma ser expressa em miliosmóis (1 miliosmol = 10^{-3} osmol). Sabendo-se, por exemplo, que o cloreto de sódio (NaCl) em água se dissocia nos íons Na^+ e Cl^- , uma molécula grama de NaCl em solução corresponderá teoricamente a 2 osmóis ou 2000 mOsm. Diz-se que uma solução de 1 mOsm de soluto em 1 litro de solvente tem concentração de 1 mOsm/l. A Tabela I ilustra as principais substâncias osmoticamente ativas no plasma, no líquido intersticial e no líquido intracelular, com os valores das contribuições em miliosmóis/litro de cada uma delas. Pode-se verificar que mais de 80% da osmolalidade total do fluido extracelular é causada pelo NaCl, enquanto que 50% da osmolalidade intracelular é determinada pelo íon potássio. A osmolalidade total dos fluidos intra e extracelular é de aproximadamente 300 mOsm/l.

O volume e a osmolalidade dos fluidos dos diversos compartimentos do organismo são parâmetros de extrema importância para a manutenção do equilíbrio do meio interno. Para garantir esse equilíbrio, o organismo lança mão de sofisticados e potentes mecanismos reguladores (Macknighth & Leaf, 1977; Mudge, 1980) que mantêm estes parâmetros dentro dos limites que são compatíveis com a vida. Apesar disso, inúmeras condições patológicas (e. g. diabetes, desidratação, hiponatremia e hipovolemia) podem perturbar drasticamente este equilíbrio e produzir consequências trágicas para o indivíduo. Na tentativa de corrigir distúrbios de tal natureza, utiliza-se, há mais de um século (Latta, 1831), além de vários outros procedimentos terapêu-

TABELA I - Composição dos fluidos plasmático, intersticial e intracelular com as contribuições em mOsm/l de cada um dos componentes na formação da osmolalidade total (Modificado de A. C. Guyton em Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara - Koogan, 1973, p. 369).

COMPONENTE	FLUIDOS		
	PLASMÁTICO	INTERSTICIAL	INTRACELULAR
	(mOsm/l H ₂ O)	(mOsm/l H ₂ O)	(mOsm/l H ₂ O)
Na ⁺	144	137	10
K ⁺	5	4,7	141
Ca ⁺⁺	2,5	2,4	0
Mg ⁺⁺	1,5	1,4	31
Cl ⁻	107	112,7	4
HCO ₃ ⁻	27	28,3	10
HPO ₄ ⁻ , H ₂ PO ₄	2	2	11
SO ₄	0,5	0,5	1
fosfocreatina	-	-	45
carnosina	-	-	14
aminoácidos	2	2	8
creatina	0,2	0,2	9
lactato	1,2	1,2	1,5
ATP	-	-	5
hexose - monofosfato	-	-	3,7
glicose	5,6	5,6	-
proteínas	1,2	0,2	4
uréia	4	4	4
Total (mOsm/l de água)	303,7	302,2	302,2

I-----
I

Obs.: - Na realidade a atividade osmolar dos solutos em uma solução é um pouco menor que o valor total expresso em mOsm/l. Costuma-se apresentar então a atividade osmolar corrigida da solução como sendo 93% do valor total em mOsm/l da solução.

ticos, da chamada terapia fluídica, que consiste na administração de soluções em várias osmolalidades e de diversos solutos, visando restabelecer o equilíbrio do meio interno.

Soluções hiperosmóticas, ou seja, soluções com osmolalidade superior à dos fluidos corporais, são empregadas para fins terapêuticos há mais de 60 anos. Penfield (1919) utilizou soluções de sais de sódio, tendo obtido efeitos benéficos, no tratamento de pacientes em hipotensão hemorrágica grave. Atualmente, soluções de vários tipos de solutos são disponíveis comercialmente e estão liberadas para uso rotineiro. O agente osmótico mais usado é o manitol. Soluções de manitol são extensivamente utilizadas na profilaxia da falência renal aguda em várias condições, como cirurgias cardiovasculares, traumatismos severos, cirurgias na presença de icterícia severa e no controle de reações hemolíticas em transfusões. Nestes casos, o efeito osmótico exercido pelo manitol no túbulo renal inibe a reabsorção de água, tendendo a manter normal a taxa de fluxo urinário (Mudge, 1980). Em quantidades suficientes, a administração de soluções de manitol na hipotensão aumenta a osmolalidade extracelular, diminuindo o intumescimento (aumento de volume) celular (Dibona & Powell Jr., 1980) e melhorando o fluxo sanguíneo renal (Flores et alii, 1972). Soluções hiperosmóticas de manitol e de glicerina são também utilizadas para redução da pressão intraocular na crise aguda do glaucoma congestivo ou como procedimento prévio a cirurgias oftálmicas (Mudge, 1980). Outras aplicações das soluções hiperosmóticas de manitol estão na redução da pressão e volume do líquido cerebrospinal e no tratamento do edema cerebral, aplicações no entanto controversas e que ainda vem

sendo investigadas (Albright et alii, 1984).

Além das variações de osmolalidade dos fluidos corporais causadas por um grande número de patologias e/ou por tratamentos com soluções de várias osmolalidades, outras situações podem alterar a osmolalidade plasmática, como são os casos do aumento de osmolalidade provocado pela injeção de contrastes nos exames radiológicos do coração (Guzman & West, 1959; Bassan et alii, 1975; Fischer & Thomson, 1978) e do aumento de osmolalidade induzida pelo exercício físico intenso (Lundvall, 1972; Lundvall et alii, 1972; Mellander, 1973; Jarhult et alii, 1975).

A aplicação terapêutica e o estudo das soluções hiperosmóticas ganharam nova dimensão e perspectivas a partir de 1977. Foi descoberto no Brasil que a infusão intravenosa de pequeno volume (10% do volume perdido) de solução hiperosmótica (2400 mOsm/l) de cloreto de sódio reverte a condição de choque hemorrágico no cão (Velasco, 1977; Velasco et alii, 1980) e no homem (De Fellipe, 1980), dispensando a transfusão sanguínea. Para se compreender melhor a importância deste tratamento basta lembrar que, se um indivíduo perde cerca de 1/3 de seu volume sanguíneo instala-se o chamado choque hemorrágico. A resposta cardiovascular, neste caso, inclui redução de fluxo sanguíneo para certos territórios orgânicos (e.g. renal, hepático e cutâneo) em proveito da manutenção do fluxo para outros territórios considerados aparentemente prioritários (e.g. cerebral, cardíaco e pulmonar). Se esta situação perdurar por um longo período, os tecidos dos leitos vasculares mal irrigados sofrem lesão celular e se instala o chamado

choque irreversível, do qual nenhuma terapia pode salvar o indivíduo da morte. Os únicos tratamentos até então conhecidos, para o choque hemorrágico, eram a reposição volêmica com transfusão sanguínea, ou com grandes volumes de soluções cristaloides isotônicas. O emprego de solução hiperosmótica de cloreto de sódio se constitui em uma nova alternativa que apresenta inúmeras vantagens quando comparada à reposição isotônica de fluidos ou à transfusão sanguínea: diminuição do volume administrado ao paciente, redução dos riscos inerentes à transfusão (e.g. contaminação e incompatibilidade sanguínea), facilidade de transporte e administração e o baixo custo relativo do cloreto de sódio.

Mudanças de osmolalidade no organismo, tanto locais quanto generalizadas, podem afetar profundamente a hemodinâmica cardiovascular por meio de influências marcantes no tono vascular, na distribuição de fluidos entre compartimentos e no volume plasmático (Mellander, 1975). Os estudos experimentais têm possibilitado visualizar um quadro geral dos efeitos de infusões de soluções hiperosmóticas na circulação. Este quadro inclui redução de resistência ao fluxo sanguíneo (Stainsby & Fregly, 1968; Gazitua et alii, 1969; Rowe et alii, 1972; Gerber et alii, 1979) com intensidade e persistência dependentes do soluto infundido e da região perfundida (Gazitua et alii, 1971), venoconstrição (Bo et alii, 1970; Gazitua et alii, 1971; Hauge & Bo, 1971) e queda da pressão arterial sistêmica (Muirhead et alii, 1947; Raizner et alii, 1973; Zhang et alii, 1983). Permanece, contudo, não entendido o mecanismo de ação envolvido na produção de tais respostas: se reflexo (Agarwall et alii, 1969; In-

glesby et alii, 1972; Raizner et alii, 1973; Ericson & Sjoquist, 1982), se mediado pelo efeito direto das soluções hiperosmóticas nas estruturas do sistema cardiovascular (Gazitua et alii, 1969; Lundwall, 1972; Atkins et alii, 1973; Jarhult et alii, 1975), ou, ainda, se causado pela ação das catecolaminas cuja liberação seria aumentada a partir da infusão das soluções hiperosmóticas (Wildenthal et alii, 1969; Liang & Hood, 1978).

Se o entendimento do mecanismo gerador das respostas vasculares às soluções hiperosmóticas é um assunto pouco conhecido e controverso, o efeito das soluções hiperosmóticas especificamente sobre o coração, é ainda menos compreendido e tem o seu estudo particularmente dificultado por mais um problema: a inexistência de um índice geral adequado para quantificar a contratilidade cardíaca "in vivo" (Katz, 1977; Milnor, 1980). Apesar disso, utilizando medidas indiretas, vários autores têm afirmado que soluções hiperosmóticas de diversos tipos de solutos (e.g. glicose, manitol, sacarose, dextrose, uréia e NaCl) produzem efeito inotrópico positivo (Wildenthal et alii, 1969; Gazitua et alii, 1971; Rowe et alii, 1972; Atkins et alii, 1973; Willerson et alii, 1975; Liang & Hood, 1978) desde que a osmolalidade não seja superior a 400 mOsm/l (Muirhead et alii, 1947; Wildenthal et alii, 1969). Avaliações da atividade contrátil tem sido feitas pela medição da derivada máxima de desenvolvimento de pressão ventricular (dp/dt_{max}). No entanto, em raras ocasiões são controladas (Wildenthal et alii, 1969) ou monitoradas (Atkins et alii, 1973; Liang & Hood, 1978) outras variáveis que afetam o desenvolvimento da pressão ventricular, como a frequência cardíaca e a pressão

diastólica final . Alguns autores consideram que esse efeito inotrópico positivo seja causado, pelo menos em parte, pela ação das catecolaminas (Wildenthal et alii, 1969; Liang & Hood, 1978), mas não se descarta, contudo, a existência de efeito inotrópico direto das soluções hiperosmóticas sobre a musculatura do coração (Atkins et alii, 1973) .

Dados importantes sobre a atividade contrátil cardíaca "in vivo" na presença de soluções hiperosmóticas vieram do trabalho de Gazitua et alii (1971). Estes autores, acoplando um transdutor de força diretamente à musculatura do coração, mostraram, em cães, que a infusão de soluções hiperosmóticas de NaCl produzia, na realidade, efeito inotrópico bifásico, com uma queda inicial (mínimo em aproximadamente 2,0 min.) seguida de aumento da força desenvolvida pelo músculo (máximo em aproximadamente 5,0 min.), ao contrário do efeito inotrópico sempre positivo de soluções hiperosmóticas de dextrose. Apesar de não terem sido controladas variáveis como a frequência cardíaca e a pressão diastólica final, este trabalho trouxe uma contribuição importante, mostrando que o efeito das soluções hiperosmóticas sobre a força de contração do músculo cardíaco pode depender do soluto utilizado e do tempo.

Face ao elevado número de problemas práticos a serem contornados e de variáveis a serem controladas para a avaliação da força contrátil cardíaca "in vivo", os investigadores têm procurado estudar o efeito da hiperosmolalidade em tecido cardíaco isolado ("in vitro"). Desta forma são eliminados inúmeros fatores que dificultam a

análise "in vivo", como a influência do sistema nervoso central e de agentes humorais. Além disso, o estudo em tecido isolado permite a medição direta da força contrátil por transdução mecano-elétrica sob controle preciso do comprimento do músculo, da frequência das contrações e do ambiente externo, fatores de grande importância para estudos de tal natureza (Blinks & Koch-Weser, 1963; Koch-Weser & Blinks, 1963).

É fato conhecido e aceito há mais de 20 anos (Koch-Weser, 1963; Wildenthal et alii, 1969; Crie et alii, 1976; Willerson et alii, 1978) que o aumento moderado (de até 250 mOsm/l) da osmolalidade do fluido de perfusão com solutos como a sacarose, a glicose, o manitol e a dextrose, produz efeito inotrópico positivo em músculo cardíaco isolado de mamíferos, em contraposição ao conhecido efeito depressor da força contrátil produzido pela hiperosmolalidade em músculo esquelético (Howarth, 1958; Godt, 1984) e em músculo cardíaco (Nayler, 1961) de anfíbio. Permanece, contudo, pouco estudado o efeito inotrópico produzido por soluções hiperosmóticas de cloreto de sódio.

Diferentemente do que ocorre no músculo esquelético, um terço do cálcio necessário para a contração do músculo cardíaco provém do ambiente extracelular, transportado por meio do chamado mecanismo de "troca sódio-cálcio" (Mullins, 1981). Este mecanismo tem também, por outro lado, papel específico (Luttgau & Niedergerke, 1958) no processo de relaxamento do músculo cardíaco transportando grandes quantidades de cálcio de dentro para fora da célula (Mullins, 1981,

Blaustein & Nelson, 1982). Aparentemente, sódio e cálcio competem por sítios específicos de membrana (Niedergerke & Lüttgau, 1957; Philipson et alii, 1980), formando compostos que são transportados para dentro e para fora da célula utilizando como energia o gradiente eletroquímico do íon sódio (Reuter & Seitz, 1968; Mullins, 1981). Este processo é dependente do potencial de membrana (V_m), de modo que a direção do transporte (para dentro ou para fora da célula) fica determinada por uma relação entre V_m e os potenciais de equilíbrio dos íons sódio e cálcio (Horackova & Vassort, 1979; Mullins, 1979; Mullins, 1981; Blaustein & Nelson, 1982). A estequiometria deste transporte não está totalmente esclarecida (Blaustein & Nelson, 1982). Embora não se possa invalidar totalmente a idéia inicial de que sejam transportados dois íons sódio para cada íon cálcio (Wilbrandt & Koller, 1948; Reuter & Seitz, 1968; Glitsch et alii, 1970; Jundt et alii, 1975; Chapman & Ellis, 1977), inúmeras evidências apontam para o fato de que, para cada íon cálcio, três ou mais íons sódio sejam transportados (Philipson et alii, 1980; Nishimoto, 1980; Kadoma et alii, 1981; Mullins, 1981; Reeve & Hale, 1984) através da membrana da célula cardíaca. Do ponto de vista termodinâmico, se o movimento de íons sódio a favor do seu gradiente eletroquímico fornece energia para o transporte de cálcio contra-gradiente de concentração via um sistema de contratransporte pode-se esperar que o gradiente de potencial eletroquímico do cálcio seja dado (Blaustein & Nelson, 1982) por:

$$\Delta\mu_{Ca^{++}} = n\Delta\mu_{Na^+} \quad (1)$$

onde $\Delta\mu_{Na}$ é o gradiente eletroquímico do íon sódio e n é a estequiometria da reação de transporte. Expandindo a expressão (1) obtém-se:

$$\frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^n \exp(- ((n-2) \cdot V_m \cdot F) / RT) \quad (2)$$

onde $[Ca^{++}]_o$ e $[Na^+]_o$ representam as concentrações extracelulares e $[Ca^{++}]_i$ e $[Na^+]_i$ as concentrações intracelulares dos íons cálcio e sódio, respectivamente. F , R e T possuem seus significados usuais e V_m é o potencial de membrana.

No caso simples de $n = 2$, a expressão (2) seria reduzida a:

$$\frac{[Ca^{++}]_o}{[Ca^{++}]_i} = \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)^2 \quad (3)$$

Aplicando este resultado ao comportamento mecânico do tecido cardíaco (Blaunstein & Nelson, 1982), conclui-se que, se a concentração extracelular de sódio é aumentada e se cálcio não é adicionado ao meio, para que seja válida a equação (3), deverá ocorrer redução da quantidade intracelular de cálcio, ocasionando conseqüentemente redução da

força contrátil.

Apesar do avanço relativo de conhecimento sobre o papel do íon sódio no transporte de cálcio através da membrana celular e, portanto, do seu papel na contração do músculo cardíaco, os estudos fisiológicos que procuram mostrar diretamente a resposta muscular cardíaca à ação de soluções hiperosmóticas de NaCl são bastante escassos na literatura. Tillish & Langer (1974) encontraram que o aumento da concentração extracelular de NaCl produz em tecido cardíaco de coelho, uma resposta oscilante no tempo, composta por efeito inotrópico negativo, seguido de efeito inotrópico positivo e finalmente retorno da atividade contrátil ao nível inicial. Estes autores mostraram ainda que a recuperação da atividade contrátil não era causada pela hiperosmolalidade, mas sim por um aumento da concentração intracelular de íons Na^+ que, ocasionando redução do efluxo de cálcio, aumentava a tensão desenvolvida pelo tecido a cada contração. Roberts et alii (1977), no entanto, estudando o tecido cardíaco de cobaia encontraram efeito inotrópico positivo para soluções hiperosmóticas de cloreto de sódio. Por outro lado, a maior parte dos autores apoiam, com base no mecanismo de troca sódio-cálcio, a idéia de que o aumento da osmolalidade por adição de cloreto de sódio produz redução da força contrátil do tecido cardíaco de rã (Luttgau & Niedergeserke, 1958), de rato (McDowall et alii, 1955) e de gato (Goethals et alii, 1975; Lee et alii, 1985).

Contudo, as enormes diferenças entre os procedimentos experimentais adotados pelos pesquisadores (e. g. uso de diferentes espé-

cies animais e/ou de tecidos de diferentes regiões do coração, emprego de diferentes solutos em soluções de osmolalidades diversas e o uso de diferentes frequências estimulatórias) dificultam concluir se os efeitos inotrópicos registrados são na realidade expressões de diferenças temporais na tomada das medições, se estes efeitos estariam ou não sendo influenciados significativamente pela frequência estimulatória, pela ação de neurotransmissores liberados do tecido em estudo, ou ainda, em que medida o efeito inotrópico negativo do aumento da concentração extracelular de sódio estaria sendo influenciado pelo já conhecido efeito inotrópico positivo da hiperosmolalidade.

O presente trabalho foi motivado pelo interesse no entendimento do mecanismo de ação envolvido no tratamento do choque hemorrágico com soluções hiperosmóticas de cloreto de sódio e foi definido a partir da aparente inexistência de um estudo sistemático sobre o efeito direto de tais soluções sobre o tecido cardíaco. Neste sentido, o seu objetivo geral foi caracterizar qualitativa e quantitativamente o efeito de soluções hiperosmóticas de cloreto de sódio sobre a atividade contrátil do tecido cardíaco isolado de rato. Para isto procurou-se comparar os efeitos de soluções feitas hiperosmóticas por adição de diferentes solutos (NaCl, sacarose e cloreto de colina), verificar a possível participação dos neurotransmissores na gênese das respostas, estudar a influência da frequência de contrações do tecido na resposta às soluções hiperosmóticas e ainda, obter separadamente os efeitos produzidos pela hiperosmolalidade e pelo aumento da concentração extracelular de NaCl.

2. OBJETIVOS

A osmolalidade plasmática pode aumentar em condições fisiológicas, como no exercício físico intenso (Lundval et alii, 1972; Lundvall, 1972; Mellander, 1973; Jarhult et alii, 1975), ou em condições patológicas, como no diabetes e na desidratação (Mudge, 1980). Outras condições podem também elevar a osmolalidade plasmática localmente, como é o caso na injeção de contrastes em exames radiológicos do coração (Bassan et alii, 1975), ou de modo generalizado, como acontece após infusão de soluções hiperosmóticas na profilaxia da falência renal aguda (Flores et alii, 1972) ou no tratamento do glaucoma congestivo (Mudge, 1980).

Atualmente, soluções hiperosmóticas de NaCl vem sendo utilizadas, com sucesso, no tratamento do choque hemorrágico, em substituição à transfusão sanguínea (Velasco, 1977; De Fellipe et alii, 1980; Lopes et alii, 1980; Velasco et alii, 1980), trazendo nova perspectiva para o tratamento do paciente grave e motivação para o estudo das soluções hiperosmóticas.

Aumentos locais ou generalizados de osmolalidade plasmática podem produzir efeitos sobre a dinâmica cardiovascular por afetarem o tono vascular e a distribuição de fluidos nos diversos compartimentos orgânicos (Mellander, 1975), além de produzirem efeitos sobre a atividade bombadora do coração (Gazitua et alii, 1969; Wildenthal et alii, 1969; Atkins et alii, 1973).

O interesse pelo conhecimento do mecanismo de ação envolvido no tratamento do choque hemorrágico com soluções hiperosmóticas de NaCl e a falta de sistematização dos dados da literatura quanto a influência direta de tais soluções sobre a atividade contrátil cardíaca motivaram o presente trabalho com o seguinte objetivo específico:

Caracterizar qualitativa e quantitativamente o efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl sobre a força contrátil do tecido cardíaco isolado de rato, procurando verificar a existência de inotropismo positivo ou negativo e identificar fatores envolvidos na gênese do efeito inotrópico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Foram utilizados ratos ("Rattus norvergicus" Berkenhout, var. albina) Wistar, machos, pesando de 250 a 300 gramas e provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais eram alojados em gaiolas coletivas recebendo água e ração "ad libitum" e não sofriam qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

3.2- PRODUTOS QUÍMICOS

Foram utilizados os seguintes sais, todos de padrão analítico: Cloreto de sódio, Cloreto de colina, cloreto de potássio, cloreto de cálcio bihidratado, fosfato ácido de potássio, sulfato de magnésio heptahidratado (todos fabricados pela Merck A. G.). Além disso utilizou-se glicose e sacarose (Fabricação Quimibrás Indústrias Químicas S/A - Brasil) e os seguintes fármacos: Fenoxibenzamina (base livre), cloridrato de propranolol e sulfato de atropina (fabricação Sigma Co., USA).

3.3- SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

a) Solução nutriente controle

Como solução controle foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição química: NaCl - 118,07 mM, KCl - 4,748 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 2,33 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 1,193 mM, NaHCO_3 - 25,0 mM, KH_2PO_4 - 1,183 mM e glicose 11,101 mM. Esta solução, assim como todas as outras soluções nutrientes utilizadas neste trabalho, era saturada com mistura carbogênica (95% O_2 , 5% CO_2) durante a realização de todos os experimentos. Esta solução apresentava um pH de $7,4 \pm 0,2$, uma osmolalidade (atividade osmolar medida) de 288 ± 5 mOsm/l e era mantida, como todas as soluções fisiológicas utilizadas neste trabalho, à temperatura de $36,5^\circ\text{C}$.

b) Soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose

As soluções hiperosmóticas foram obtidas por adição à solução nutriente controle da quantidade necessária do soluto (NaCl, sacarose) para produzir a osmolalidade (medida) desejada. Construiu-se uma curva padrão para cada soluto, contendo no eixo das abscissas, o incremento de osmolalidade ($\Delta\text{mOsm/l}$) que se desejava produzir, e no eixo das ordenadas, a quantidade de soluto (gramas) a ser adicionada a 100 ml da solução controle. As concentrações dos solutos para obtenção das soluções hiperosmóticas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela IIa.

TABELA II (a)-Concentrações, de cada soluto, utilizadas na produção de soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose. Os incrementos de osmolalidade produzidos na osmolalidade da solução nutriente controle (300 mOsm/l) foram de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l.

Incremento de osmolalidade da solução controle (mOsm/l)	Incremento na concentração do soluto (mM)		osmolalidade final aprox. (mOsm/l)
	NaCl	Sacarose	
50	31,25	50,0	350
100	57,14	100,0	400
150	97,83	150,0	450
200	113,31	200,3	500

(b) Composição das soluções de estoque que adicionadas ao fluido do banho produziam um aumento de osmolalidade de 150 mOsm/l. As concentrações apresentadas nesta tabela representam os incrementos nas concentrações das soluções com relação a solução de Krebs-Henseleit.

Soluto	concentração na sol. estoque (mM)	vol.adic./ vol.final	incremento final no banho (mM)
NaCl	978,3	2/20	97,83
CH ClNO	489,15	4/20	97,83
Sacarose	750,01	4/20	150,00
NaCl + CaCl ₂	978,3 (NaCl)	2/20	87,83
	47,17 (CaCl ₂)		4,2

c) Solução hiperosmótica de NaCl com cálcio aumentado

Esta solução foi obtida por adição de cloreto de cálcio bi-hidratado à solução hiperosmótica de NaCl ($\Delta mOsm/l = 150$). A concentração final de cloreto de cálcio (7,22 mM) foi calculada de modo que o valor da relação $[Ca^{++}]_o/[Na^+]_o^2$ fosse idêntico ao da solução controle ($1,276 \times 10^{-4}$).

d) Solução hiperosmótica de cloreto de colina

Esta solução foi obtida adicionando-se à solução controle 97,83 mM de cloreto de colina (CH_5ClNO) para produzir uma solução com osmolalidade final de 450 mOsm/l ($\Delta mOsm/l = 150$). Foi adicionado ainda a esta solução, sulfato de atropina, na concentração de 1 μM , para bloqueio de receptores colinérgicos.

e) Solução com baixa concentração de sódio e de cálcio.

Para obtenção desta solução, reduziu-se em 97,8 mM a concentração de cloreto de sódio e em 2,27 mM a concentração de cloreto de

cálcio da solução controle, de modo a manter constante a relação $[Ca^{++}]_o / ([Na^+]_o)^2$. A esta solução foram adicionados 97,8 mM de cloreto de colina para manter constante a osmolalidade total (aprox. 300 mOsm/l) e 1 μ M de sulfato de atropina para bloqueio colinérgico. A concentração final de cálcio nesta solução era ajustada (aumentada), no entanto, de modo que a T_{max} ficasse idêntica àquela obtida na solução controle. Em experimentos efetuados para determinação da estequiometria do transporte de sódio e cálcio adicionou-se sacarose, ao invés de cloreto de colina, na concentração de 150 mM para manutenção da osmolalidade e de 300 mM para obtenção de hiperosmolalidade (Δ mOsm/l = 150).

f) Solução com baixa concentração de cálcio.

Esta solução foi obtida a partir da solução controle, reduzindo-se em 2,27 mM a concentração de cloreto de cálcio e adicionando-se sulfato de atropina na dose de 1 μ M para bloqueio colinérgico. A mesma quantidade de cálcio adicionada, para manter T_{max} , na solução com baixa concentração de sódio e de cálcio (vide item 3.3 e, deste trabalho) era também adicionada para confecção desta solução.

g) Solução com concentração de Na^+ normal, concentração de Ca^{++} baixa e

alta osmolalidade.

Idem à solução do item anterior (f), exceto pela adição de 150 mM de sacarose para obtenção de hiperosmolalidade.

3.4- INSTRUMENTAÇÃO

Descreve-se a seguir a instrumentação utilizada, com detalhes técnicos sobre cada instrumento:

a) "BANHO" PARA TECIDO ISOLADO: constituía-se de uma câmara de vidro (fabr. Instituto de Química - USP, São Paulo) composta por dois compartimentos, um externo, para circulação de água aquecida, e outro interno, com volume de 20 ml, para contenção da solução nutriente e do tecido cardíaco em estudo. O compartimento interno possuía uma saída e uma entrada, à qual se encontrava ligado um trocador de calor (serpentina) com capacidade para 40 ml, onde se efetuava o aquecimento da solução nutriente que entrava no reservatório interno;

b) SISTEMA DE BOMBEAMENTO DE ÁGUA: este sistema era composto por um reservatório de água (vol. 10 l), de PVC, no qual se encontravam um aquecedor (potência de 1000 Watts), bem como um termistor para detecção da temperatura da água. Acoplada ao reservatório de água, encontrava-se uma bomba (fabr. Sermar Ind. Com. - São Paulo) que produzia

circulação de água aquecida à parte externa do banho para tecido isolado. O controle de temperatura era feito por meio de um circuito eletrônico (fabr. Instituto de Física, USP, São Paulo - SP) especialmente desenvolvido para este fim. Deste modo a temperatura era mantida em $36,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$;

c) ELETRODOS (fabr. Centro de Engenharia Biomédica, UNICAMP, Campinas - SP): foram utilizados, para estimulação elétrica do tecido cardíaco, eletrodos de platina montados em uma das extremidades de uma haste acrílica, que possuía, na outra extremidade uma barra metálica para fixação a um micromanipulador, e terminais para acoplamento dos eletrodos ao estimulador elétrico;

d) MICROMANIPULADOR: adaptado (Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo - SP) a partir de um microscópio. Este instrumento possuía uma haste vertical móvel, à qual se fixava o eletrodo. A movimentação desta haste possibilitava ajustes micrométricos do comprimento inicial do tecido cardíaco em estudo e consequentemente da tensão inicial que se aplicava a toda a preparação;

e) TRANSDUTOR DE FORÇA * (Fabr. Narco Bio - Systems, Houston, Tx - USA, mod. F60): Instrumento adequado para a medição de força sob regime de contração isométrica, com as seguintes características básicas: faixa de linearidade de 0 a 60 gramas, deslocamento linear (máximo) $2\mu\text{m/g}$, sensibilidade de $0,02\text{g/cm}$, linearidade maior que 99,5% do fundo de escala;

f) POLÍGRAFO * (Fabr. Narco Bio - Systems, Houston, Tx - USA, mod. MK - IV): Instrumento de registro de 4 canais, todos com excursão retilínea e resposta plana de 0 a 60 Hz, que foi utilizado para documentação dos experimentos realizados;

g) OSCILOSCÓPIO ** (Fabr. Tektronix, Beaverton, Oregon - USA, mod. 5111A, com memória): Este instrumento foi utilizado para medição dos parâmetros da contração do músculo cardíaco;

h) CÂMERA FOTOGRÁFICA ** (Fabr. Tektronix, Beaverton, Oregon - USA, mod. 5C5 - polaroid): Esta câmera era acoplada esporadicamente à tela do osciloscópio para obtenção de fotografias para documentação de experimentos típicos;

i) OSMÔMETRO (Fabr. Fisk - USA, MOD. OM): este instrumento foi usado para medição da osmolalidade das soluções hiperosmóticas;

j) ESTIMULADOR ELÉTRICO (Fabr. Narco Bio - Systems, Houston, Tx, - USA, mod. SI - 10): este estimulador podia fornecer pulsos retangulares de tensão, mono e bipolares, em frequências de 0,1 a 1000 Hz por meio de gerador interno, com duração de pulsos variando de 0 a 100 ms e amplitude de 0 a 100 Volts. Além disso o instrumento permitia controle temporal do fornecimento dos pulsos por disparo externo.

k) DISPARADOR PROGRAMÁVEL (Fabr. Centro de Engenharia Biomédica - UNICAMP, Campinas, SP, mod DP1.1): Este instrumento, baseado no microprocessador Intel 8085A, fornecia pulsos para controle do processo

de estimulação e registro das contrações do tecido cardíaco. O disparador programável foi especialmente construído (vide apêndice para maiores detalhes sobre o instrumento) para disparar (regular ou aleatoriamente) o estimulador elétrico e o osciloscópio e ainda fornecer um pulso para gravação, marcando o instante de aplicação dos estímulos elétricos à preparação biológica. No presente trabalho a principal aplicação do disparador programável foi na determinação da relação força-frequência que exige controle rigoroso na mudança de uma frequência para outra.

Na figura 01 apresenta-se um esquema da instrumentação utilizada na maior parte dos experimentos realizados para medição da força desenvolvida pelo tecido cardíaco isolado de rato sob efeito de soluções hiperosmóticas.

3.5- PREPARAÇÃO BIOLÓGICA

Foram utilizadas preparações com aurículas esquerdas isoladas de ratos. O método empregado para montagem experimental foi adaptado a partir da técnica de preparação da aurícula direita isolada de cobaia, para estudo da frequência espontânea (Hawkins, 1962).

Os animais eram sacrificados com um forte golpe na cabeça e imediata secção dos vasos sanguíneos cervicais para rápido escoamento do sangue do interior das cavidades do coração. Em seguida, o tórax

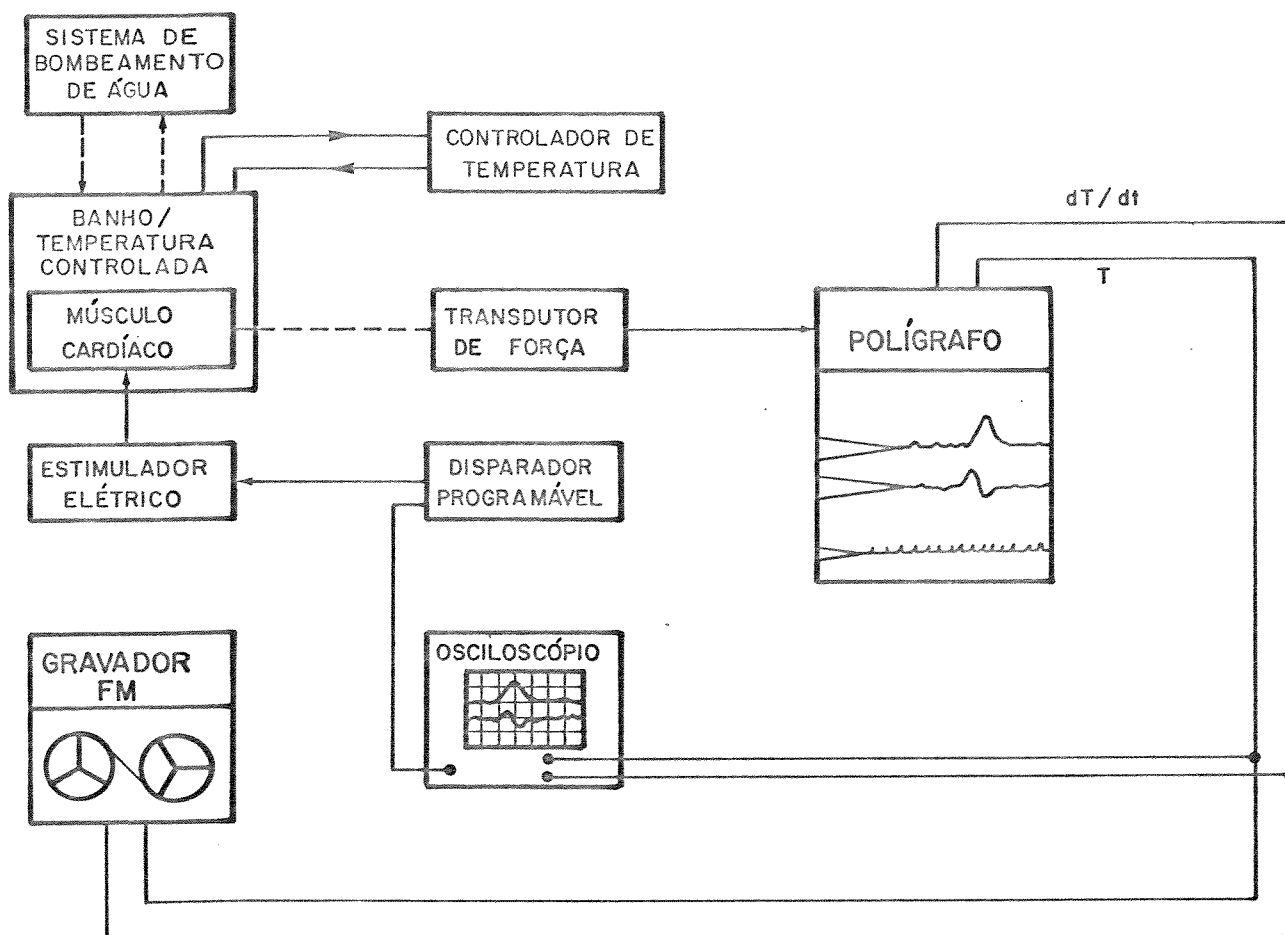


Fig.01- Esquema da instrumentação utilizada para captação e registro da atividade contrátil em tecido cardíaco isolado de rato. A linha tracejada indica acoplamento mecânico e as linhas contínuas indicam as ligações elétricas.

do animal era aberto, o coração era removido e colocado em um recipiente (volume 50 ml) contendo solução fisiológica (Krebs - Henseleit) à temperatura ambiente, mantido sob forte borbulhamento com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂). Nestas condições, o coração permanecia contraindo-se espontânea e ritmicamente até que (em 1 a 2 min.) todo sangue residual fosse bombeado fora dos ventrículos e átrios. Em seguida, o coração era colocado em placa de Petri, onde a aurícula esquerda era dissecada e removida.

Um fio de algodão era amarrado em uma das extremidades da aurícula e a extremidade oposta era fixada a dois eletrodos de platina para estimulação do tecido cardíaco. Todo o conjunto composto pelo fio de algodão, aurícula e eletrodos era, então, colocado em banho para tecido isolado contendo 20 ml da solução controle. A haste acrílica do eletrodo era fixada ao micromanipulador e o fio de algodão era amarrado à barra sensora do transdutor de força sob tensão inicial de aproximadamente 0,2gf (Fig. 02). Nestas condições o tecido cardíaco permanecia estimulado na frequência de 64 est./min. para estabilização.

3.6- CAPTAÇÃO, REGISTRO E MEDIÇÃO DA FORÇA CONTRÁTIL

Produziam-se contrações no tecido auricular esquerdo isolado de rato por estimulação elétrica. Os estímulos eram pulsos bipolares de tensão, fornecidos pelo estimulador elétrico, sob comando do disparador programável. A intensidade dos estímulos (tipicamente 1,2 volts) era ajustada para 20% acima do valor limiar (mínima tensão necessária para produzir uma contração da preparação), visando minimi-

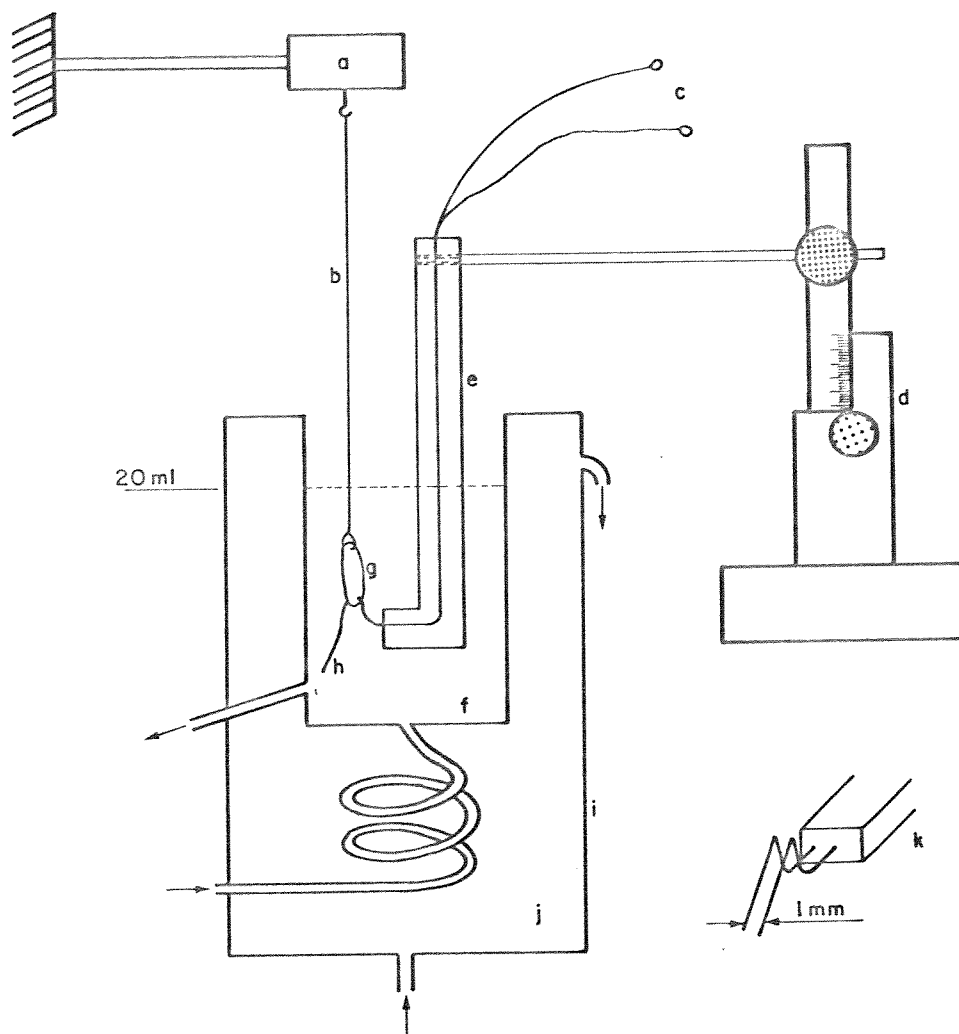


Fig.02- Esquema da montagem experimental com aurícula esquerda isolada de rato. (a) transdutor de força, (b) fio de algodão, (c) terminais dos eletrodos, (d) micromanipulador, (e) haste acrílica dos eletrodos, (f) solução fisiológica, (g) tecido cardíaco, (h) eletrodos de platina, (i) câmara de vidro, (j) água à temperatura de 36,5 C, (k) vista frontal do par de eletrodos de platina utilizados para estimulação elétrica do tecido cardíaco.

zar a liberação de neurotransmissores do tecido (Blinks, 1965) e a duração era de 5 ms. A frequência dependia, em particular, do experimento a ser executado.

As contrações auriculares eram detetadas por transdução mecânica - elétrica de força sob regime de contração isométrica (contração sem variação do comprimento do músculo). O sinal elétrico correspondente era alimentado ao polígrafo onde era filtrado (filtro passa baixas, $f_c = 100$ Hz) e diferenciado com relação ao tempo. O sinal correspondente a tensão mecânica (T) desenvolvida e sua primeira derivada temporal (dT/dt) eram gravados em fita magnética e registrados continuamente em papel. Além disso estes sinais eram alimentados ao osciloscópio para monitoração e medição durante os experimentos. O controle temporal da aplicação dos estímulos, e o disparo externo do osciloscópio eram efetuados pelo disparador programável.

As medições de força eram efetuadas com o tecido contraindo-se a partir de um comprimento final (l_f) igual a 95% do comprimento ótimo (l_o) para desenvolvimento de força (Katz, 1977). O comprimento l_o era determinado aumentando-se o comprimento inicial (l_i) do tecido, estabelecido no início da montagem, até que a tensão ativa desenvolvida atingisse um valor máximo. A figura 03 ilustra a relação entre o comprimento e a tensão obtida em seis aurículas esquerdas isoladas de rato.

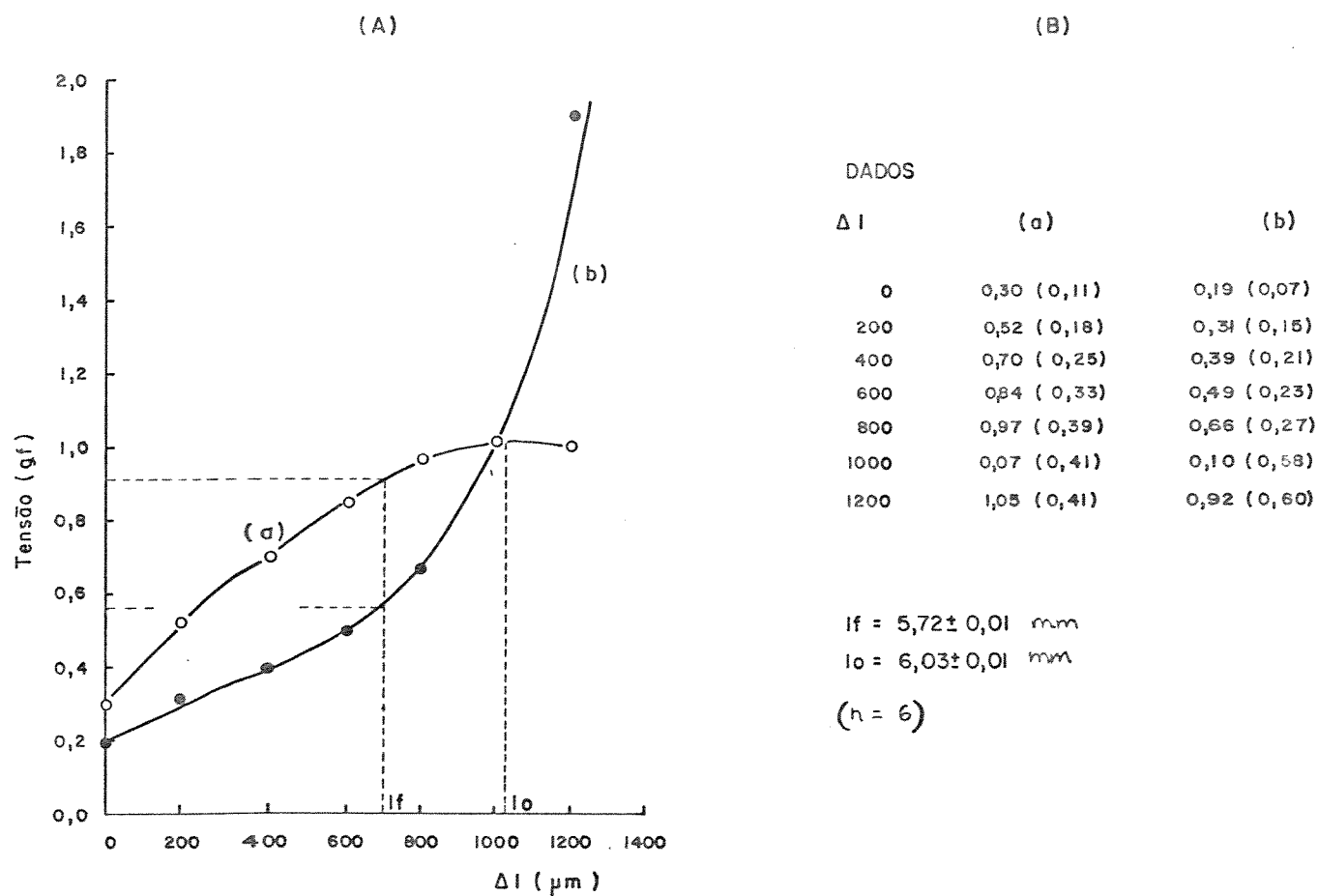


Fig.03- Relação comprimento-tensão em tecido cardíaco isolado de rato. (A) Ordenadas: tensão ativa (a) e tensão de repouso (b). Abscissas: Incrementos de comprimento a partir do comprimento inicial $l_i = 5\text{mm}$. (B) Médias e desvios para o gráfico em (A). Frequência de estimulação de 64 estímulos/minuto. Peso médio dos tecidos (aurículas esquerdas): $17,78 \pm 4,41 \text{ mg}$.

O comprimento final (lf) médio dos tecidos foi de $5,72 \pm 0,01$ mm. Neste comprimento o tecido ficava submetido a uma tensão de repouso de 0,5 a 0,6gf e desenvolvia tensões na faixa de 0,8 a 1,0 gf sob estimulação em torno de 1 Hz de frequência. A figura 04 ilustra a "forma de onda" (típica) da tensão desenvolvida pelo tecido auricular esquerdo isolado de rato, no comprimento "lf" sob regime de contração isométrica. Nesta figura estão apresentados também os parâmetros que foram utilizados, no presente trabalho, para avaliação da força contrátil do tecido cardíaco.

3.7- PERÍODO DE ESTABILIZAÇÃO E DE PRÉ-TRATAMENTO DO TECIDO CARDÍACO

Após o estabelecimento do comprimento ótimo para a preparação, o tecido atrial era deixado estabilizar na solução controle (Krebs - Henseleit) por um período de 40 minutos sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min.

Em três grupos experimentais (18 animais), após o período de estabilização, realizou-se pré-tratamento do tecido com fenoxibenzamina ($10\mu\text{M}$) para bloqueio irreversível de receptores colinérgicos (Furchgott, 1967) e adrenoreceptores alfa e com propranolol (30 nM), para bloqueio dos adrenoreceptores beta. A fenoxibenzamina era deixada em contato com o tecido durante 20 minutos, após o que, era removida, voltando-se à solução controle. O propranolol era então adicionado e deixado estabilizar com o tecido por 40 minutos. Propranolol era também adicionado às soluções hiperosmóticas a serem aplicadas ao tecido

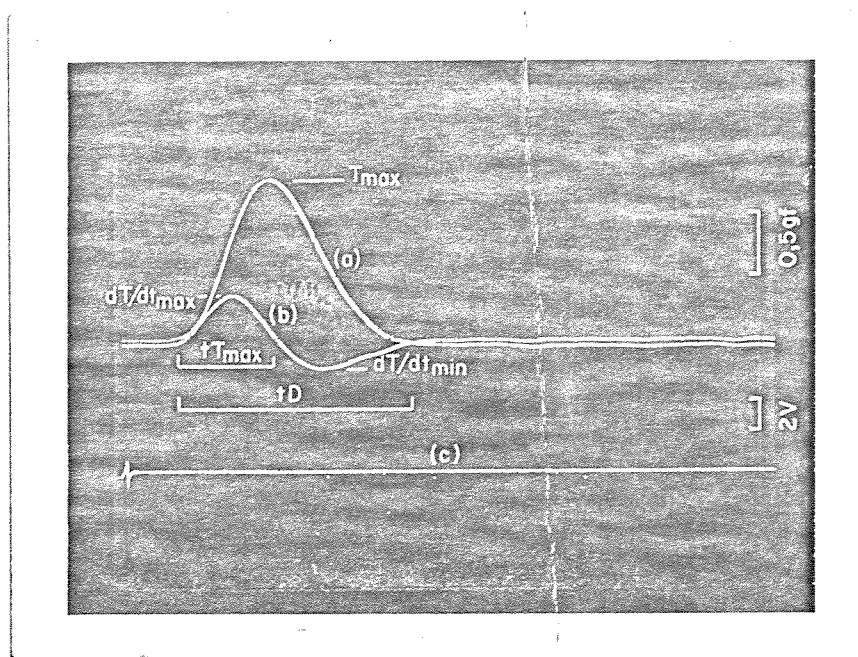


Fig.04- Tensão desenvolvida pelo tecido cardíaco (aurícula esquerda) isolado de rato, sob regime de contração isométrica, no comprimento "lf" (vide texto para detalhes) e sob estimulação elétrica na frequência de 4 est./min. Traçados: (a)- Tensão, T (gf); (b)- derivada temporal de T , dT/dt (gf/s); (c)- estímulo elétrico, (volts). Parâmetros utilizados para avaliação da atividade contrátil: T_{max} - tensão máxima desenvolvida pelo tecido; dT/dt_{max} e dT/dt_{min} - máxima e mínima derivadas temporais de T ; t_{Tmax} - tempo em milissegundos para T atingir T_{max} ; t_D - tempo total de duração do abalo contrátil expresso em milissegundos.

auricular. Este bloqueador era mantido em contato com o tecido durante todo o experimento.

Em experimentos que envolveram o uso de soluções de cloreto de colina adicionou-se sulfato de atropina, 100 nM, para bloqueio de receptores colinérgicos (Luttgau & Niedergeserke, 1958). O tempo de estabilização para este bloqueio era de 40 minutos.

O bloqueio de receptores alfa e beta adrenérgicos e receptores colinérgicos muscarínicos foi efetuado com o objetivo de eliminar uma possível atuação, nestes receptores, de neurotransmissores passíveis de serem liberados do tecido cardíaco, pela ação das soluções hiperosmóticas (Koch - Weser, 1963) e/ou pela própria estimulação elétrica (Blinks & Koch - Weser, 1963).

3.8- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

a) Determinação do curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas sobre T_{max}.

Este procedimento experimental foi utilizado para verificar o efeito produzido pelo aumento rápido e mantido de osmolalidade com

soluções tornadas hiperosmóticas por adição de NaCl, sacarose e cloreto de colina. Para os solutos NaCl e sacarose os experimentos foram realizados com e sem pré-tratamento e no caso do cloreto de colina, efetuou-se bloqueio colinérgico (vide item 3.7 deste trabalho).

Após os períodos de estabilização e de pré-tratamento (quando efetuado), com o tecido sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min., soluções de estoque, concentradas, de diversos solutos foram adicionadas ao banho (vide Tabela IIb, que contém os volumes e as concentrações utilizadas). As soluções concentradas foram preparadas por adição à solução de Krebs-Henseleit de quantidade suficiente de soluto de modo que o volume tomado para aplicação ao tecido elevasse a osmolalidade total do banho em 150 mOsm/l. O controle experimental foi obtido por adição ao fluido do banho de 4 ml de solução de Krebs-Henseleit. A temperatura das soluções hiperosmóticas era de 36,5°C. Nestas condições as variações produzidas sobre T_{max} eram medidas diretamente do osciloscópio durante trinta minutos. As medições eram efetuadas, a partir do início, de trinta em trinta segundos durante os primeiros cinco minutos e depois de cinco em cinco minutos até o final do experimento.

Em três grupos experimentais (18 animais) determinou-se o curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose com o tecido estimulado na frequência de 16 est./min. Este procedimento tinha por objetivo verificar a influência da frequência sobre o curso temporal da resposta às soluções hiperosmóticas. Desejava-se de modo geral verificar se alguma fase comum nas respostas do

músculo cardíaco à soluções de diferentes naturezas (e.g. NaCl, soluto iônico com íons, que podem a cada contração atravessar a membrana celular e a sacarose, soluto não iônico, com alto coeficiente de reflexão com relação à membrana da célula cardíaca) poderia ser influenciada diferentemente pela frequência estimulatória.

b) Determinação do efeito de incrementos de osmolalidade sobre a força de contração do tecido cardíaco isolado de rato, estimulado em diferentes frequências.

Após o período de estabilização a solução nutriente do banho era substituída por solução idêntica, o que constituía o controle experimental ($\Delta mOsm/l$ nulo), ou sucessivamente por soluções hiperosmóticas com osmolalidades aumentadas de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l com NaCl ou sacarose. A substituição de soluções era feita por perfusão do fluido do banho à taxa de 40 ml/min., durante três minutos. Mediu-se previamente a osmolalidade do líquido do banho durante a troca de soluções e observou-se que a osmolalidade final desejada era atingida em menos de um minuto após o início da perfusão. A temperatura era mantida constante por aquecimento do líquido de perfusão em três níveis: no trocador de calor interno ao recipiente que continha o tecido, num trocador de calor externo adicional e no reservatório de solução perfundente. Deste modo não se detectava variação de temperatura superior a $0,2^{\circ}C$. Em seguida à troca de solução, deixava-se que o tecido se reestabilizasse, na nova solução, por mais vinte mi-

nutos. Após este período, a força desenvolvida pelo músculo cardíaco era avaliada em três diferentes frequências: 4, 16 e 64 est./min., com um tempo para reequilíbrio em cada nova frequência de 20 minutos. Neste caso foram medidos todos os parâmetros (T_{max} , dT/dt_{max} , dT/dt_{min} , tT_{max} e tD) definidos para avaliação da força contrátil (vide item 3.6 fig. 04). A sequência de aplicação das frequências foi 64, 4, 16, 4 e 64 tendo sido utilizados os dados das três últimas frequências.

c) Determinação da relação força-frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato. ,

A relação entre a força desenvolvida pelo tecido cardíaco e a frequência estimulatória (relação força - frequência) foi determinada nos mesmos animais dos quais se determinou o curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas. Deste modo, trinta minutos após a aplicação das soluções hiperosmóticas de NaCl ou de sacarose (ambas com $\Delta mOsm/l$ de 150) ou da solução de Krebs - Henseleit (controle), uma nova frequência era selecionada e disparada sob comando do disparador programável. Assim, o instante de mudança de uma frequência para outra era precisamente definido e isento de possíveis erros de operação. As frequências utilizadas, neste estudo, para estimulação do tecido cardíaco foram: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 estímulos/minuto aplicadas em ordem crescente. Um tempo de 15 minutos era esperado para reestabilização da força contrátil em cada nova fre-

quência. Após a estabilização, além do acionamento do sistema de gravação, uma amostra do sinal da contração muscular era registrado na tela do osciloscópio (vide fig. 04, item 3.6 deste trabalho, traçado típico da força desenvolvida pelo tecido auricular esquerdo de rato), e então medidos todos os parâmetros (T_{max} , dT/dt_{max} , tT_{max} e tD , vide item 3.6 deste trabalho, fig. 04, descrição dos parâmetros), previamente definidos para avaliação da força de contração. A relação força - frequência foi realizada após pré-tratamento (vide item 3.7 deste trabalho).

d) Determinação do curso temporal do efeito do aumento da concentração extracelular de NaCl, sem produção de efeito osmótico.

Após o período de estabilização, a solução isosmótica com baixa concentração de NaCl e de $CaCl_2$ (vide item 3.3 e, deste trabalho) era aplicada em substituição à solução do banho. A operação era efetuada sob controle de temperatura de modo que esta se mantivesse sempre em $36,5 \pm 0,2^\circ C$. Após quinze minutos, a solução, isosmótica, com baixa concentração de cálcio (vide item 3.3 f, deste trabalho), era aplicada ao banho e T_{max} medido a cada trinta segundos, nos primeiros cinco minutos e depois a cada cinco minutos até o final do experimento.

e) Determinação do curso temporal do efeito do aumento da concentra-

ção extracelular de NaCl em meio hiperosmótico.

Após 40 minutos de estabilização na solução hiperosmótica de sacarose (vide item 3.3 b), a solução hiperosmótica com baixa concentração de NaCl e de CaCl_2 (vide item 3.3 e) era aplicada em substituição à solução do banho. A operação era efetuada sob controle de temperatura de modo que esta se mantivesse sempre em $36,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Após 20 minutos, a solução com baixa concentração de cálcio, Na normal e incremento de 150 mOsm/l (vide item 3.3 g) era colocada em substituição à solução do banho. Tmax era então medido a cada 30 segundos dentro dos primeiros 5 minutos e depois a cada 5 minutos até o final do experimento.

f) Determinação da estequiometria da troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$ em soluções iso e hiperosmóticas.

Partindo - se da equação (2), descrita no item 1, pag. 12, deste trabalho, fazendo $V_m = 0$ e rearranjando obtem - se:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_o}{([\text{Na}^+]_o)^n} = \frac{[\text{Ca}^{++}]_i}{([\text{Na}^+]_i)^n} \quad (4)$$

Assumindo - se que: (a) $T_{max} = f([Ca^{++}]_o/[Na^+]_o^n)$ (vide Katz, 1975); (b) a função f não se altere quando as concentrações dos íons sódio e cálcio são modificadas e (c) a estequiometria da troca Na^+/Ca^{++} não se altere com o potencial de membrana, então se T_{max}^* (valor de T_{max} quando as concentrações de sódio e cálcio são alteradas no meio externo) for igual a T_{max} , ou seja,

$$T_{max}^* = T_{max}$$

então

$$[Ca^{++}]_o/[Na^+]_o^n = [Ca^{++}]_{o^*}/[Na^+]_{o^*}^n$$

ou

$$([Na^+]_{o^*}/[Na^+]_{o^*})^n = [Ca^{++}]_{o^*}/[Ca^{++}]_{o^*}.$$

Tomando - se o logaritmo decimal desta última equação obtém-se finalmente :

$$n = \log ([Ca^{++}]_{o^*}/[Ca^{++}]_o) / \log ([Na^+]_{o^*}/[Na^+]_o).$$

No presente trabalho o valor de n foi calculado modificando - se as concentrações dos íons sódio e cálcio da solução nutriente de acordo com as soluções com baixa concentração de sódio e cálcio apresentadas no item 3.3 (e) deste trabalho. As soluções com baixa concentração de sódio e cálcio foram obtidas inicialmente supondo-se $n = 2$. Em alguns experimentos foi necessário adicionar cálcio para que

T_{max}^* fosse igual a T_{max} . Com as novas concentrações de cálcio os valores de n foram calculados em cada experimento e seus valores médios e respectivos intervalos de confiança foram obtidos para verificar se o valor de n , assumido ser igual a dois, era satisfatório.

3.9- PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A determinação quantitativa do efeito de incrementos de osmolalidade sobre a força de contração do tecido auricular esquerdo isolado de rato foi efetuada por análise de variância trifatorial envolvendo solutos, doses e frequências (Keppel, 1982).

A avaliação do curso temporal e da relação força-frequência foi efetuada por meio de análise de variância bifatorial (Keppel, 1982). Retas de regressão, pelo método dos mínimos quadrados (Paradine & Rivett, 1974), foram determinadas para estudar a taxa de recuperação (na presença de soluções de NaCl) e a taxa de incremento (na presença de soluções de sacarose) da atividade contrátil do tecido cardíaco.

Todos os contrastes foram determinados pelo teste "t" de Student (Keppel, 1982; Paradine & Rivet, 1974).

Obs.: considerou-se efeito inotrópico negativo (positivo) os casos onde houve redução (aumento) significativa (o) de T_{max} e/ou dT/dt_{max} sem aumento (redução) significativo (a) de t_D . Aumentos significati-

vos de t_D sem redução de T_{max} e dT/dt_{max} foram considerados como efeito inotrópico positivo.

4.RESULTADOS

4.1- Análise trifatorial do efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose sobre a força contrátil do tecido auricular esquerdo isolado de rato.

Esta análise envolveu a medida de três variáveis; doses (incrementos de osmolalidade de 0,50,100,150 e 200mOsm/l), tratamentos (NaCl e Sacarose) e Frequências (4,16 e 64 est./min.), e foi aplicada a todos os parâmetros escolhidos previamente (vide item 3.6 deste trabalho) para avaliação da força contrátil. Os resultados, para cada parâmetro, são apresentados a seguir:

4.1.1 Análise de Tmax (tensão máxima desenvolvida).

Na tabela III encontram-se as médias de Tmax obtidas do tratamento do tecido auricular esquerdo isolado de rato, com soluções hiperosmóticas (incrementos de 50,100,150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução controle) de NaCl e de sacarose e sob estimulação elétrica nas frequências de 4, 16 e 64 est./min. Estes resultados estão ilustrados na figura 05.

TABELA III- Médias de Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências, e submetido a vários incrementos de osmolalidade (doses) do fluido nutriente. Doses: 0,50,100,150 e 200 mOsm/l por adição de NaCl ou de Sacarose. Frequências: 4,16 e 64 est./min. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

	NaCl (n=6)			SACAROSE (n=6)		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
00	1,10 (0,04)	0,87 (0,07)	0,73 (0,08)	1,14 (0,05)	0,89 (0,04)	0,78 (0,06)
50	1,03 (0,05)	0,77 (0,05)	0,54 (0,04)	1,17 (0,05)	1,07 (0,06)	0,78 (0,06)
100	1,07 (0,03)	0,77 (0,05)	0,46 (0,06)	1,21 (0,06)	1,21 (0,07)	0,84 (0,07)
150	1,07 (0,03)	0,88 (0,05)	0,45 (0,05)	1,14 (0,06)	1,16 (0,06)	0,95 (0,05)
200	0,94 (0,04)	0,84 (0,04)	0,44 (0,05)	1,02 (0,05)	1,02 (0,05)	0,91 (0,06)

a- frequência em est./min.; b- incrementos produzidos na osmolalidade da solução nutriente em mOsm/l; n- número de experimentos.

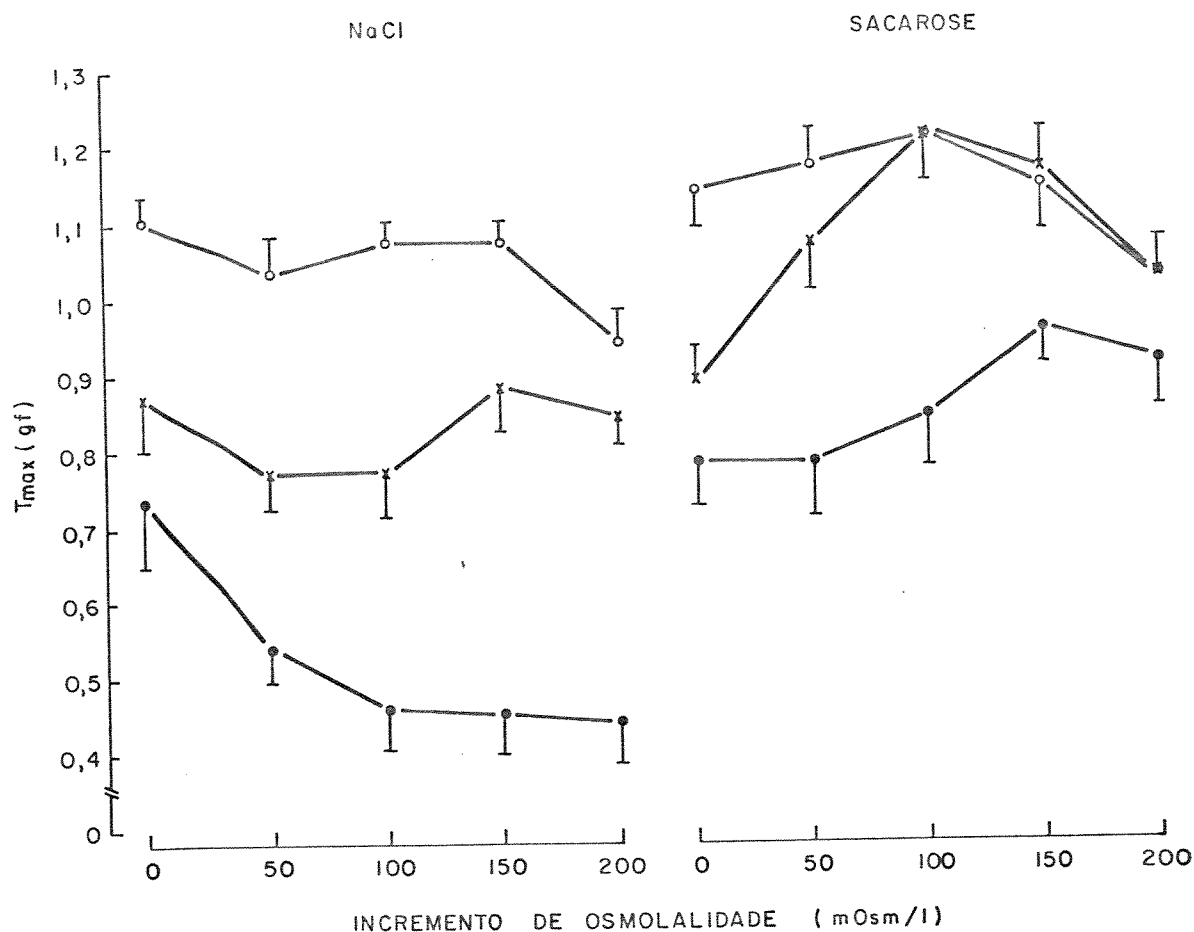


Fig.05- Tensão máxima desenvolvida (T_{max}) pelo tecido auricular esquerdo isolado de rato e estimulado eletricamente em diferentes frequências, sob efeito de soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose com osmolalidades acrescidas de 50,100,150 e 200 mOsm/l a partir da solução controle (Krebs-Henseleit). Ordenadas: T_{max} (gf). Abscissas: incremento de osmolalidade do fluido nutriente por adição de solução hiperosmótica (mOsm/l adicionados) de NaCl ou de sacarose. Simbologia: (o)-4, (x)-16 e (•)-64 est./min.

Nos quadros 01,02 e 03 estão apresentados os resultados da análise de variância para Tmax e dos testes "t" de Student, realizados para comparação dos contrastes. Desta análise os seguintes resultados conclusivos foram obtidos:

a) Tmax foi significativamente diferente entre frequências e tratamentos ($p < 0,001$);

b) o tratamento com NaCl diminuiu Tmax significativamente na frequência de 4 est./min. apenas na dose de 200 mOsm/l ($p < 0,05$). Na frequência de 64 est./min. o tratamento com NaCl reduziu Tmax nas doses de 100,150 e 200 mOsm/l ($p < 0,05$), de modo dose-dependente ($p < 0,001$);

c) o tratamento com sacarose aumentou Tmax significativamente na frequência de 64 est./min. apenas na dose de 150 mOsm/l ($p < 0,05$). Na frequência de 64 est./min. o tratamento com sacarose aumentou Tmax nas doses 50 ($p < 0,05$), 100 e 150 mOsm/l ($p < 0,01$) de modo dose dependente;

d) na solução controle (dose 0 mOsm/l), observou-se uma relação significativa ($p < 0,001$) entre a frequência de contrações do tecido e Tmax. Esta relação continuou altamente significativa ($p < 0,001$) na presença de todas as doses da solução hiperosmótica de NaCl. No entanto, o tratamento com sacarose em doses elevadas (200 mOsm/l) aboliu a dependência de Tmax da frequência estimulatória;

QUADRO 01- a) resultado da análise de variância trifatorial para Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, considerando três fontes de variação: Frequências (4, 16 e 64 est./min.), doses (0,50, 100, 150 e 200 mOsm/l) e tratamentos (NaCl e Sacarose).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
FREQUÊNCIA (A)	2	145,3	***
DOSE (B)	4	1,92	NS
TRATAMENTO (C)	1	99,23	***
A X B	8	1,85	NS
A X C	2	12,40	***
B X C	4	5,91	***
A X B X C	8	2,36	*
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste t de "Student" para comparação dos contrastes (dose 00 x incrementos de osmolalidade)

	NaCl			SACAROSE		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
50	NS	NS	NS	NS	*	NS
100	NS	NS	*	NS	**	NS
150	NS	NS	*	NS	**	*
200	*	NS	*	NS	NS	NS

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; (a) - estímulos/minuto; (b) - mOsm/l.

QUADRO 02- Efeito simples da dose sobre Tmax para as diferentes frequências e tratamentos.

TRATAMENTOS	FREQUÊNCIAS (est./min.)	GL	F	
NaCl	4	4	1,331	NS
	16	4	1,183	NS
	64	4	5,325	***
SACAROSE	4	4	1,627	NS
	16	4	4,438	**
	64	4	2,367	NS

QUADRO 03- Efeito simples da frequência sobre Tmax, para os diferentes tratamentos e diferentes doses.

TRATAMENTOS	DOSES (mOsm/l)	GL	F	
NaCl	00	2	12,103	***
	50	2	21,264	***
	100	2	32,782	***
	150	2	35,440	***
	200	2	24,767	***
SACAROSE	00	2	12,699	***
	50	2	14,660	***
	100	2	15,056	***
	150	2	3,833	*
	200	2	1,477	NS

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$

e) observou-se interação significativa entre frequências, doses e tratamentos ($p < 0,05$).

4.1.2 Análise de tTmax (tempo para a tensão atingir seu máximo valor).

Na tabela IV encontram-se as médias de tTmax, obtidas do tratamento do tecido auricular esquerdo isolado de rato, com soluções hiperosmóticas (incrementos de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução controle) de NaCl e de sacarose e sob estimulação elétrica nas frequências de 4, 16 e 64 est./min. Estes resultados estão ilustrados na figura 06.

Nos quadros 04 e 05 estão apresentados os resultados da análise de variância para tTmax e dos testes "t" de Student realizados para comparação de contrastes. Desta análise os seguintes resultados conclusivos foram obtidos:

a) O valor de tTmax não foi diferente entre frequências e tratamentos, no entanto, foram observadas diferenças significativas entre doses ($p < 0,001$);

b) tTmax não foi alterado com o tratamento com NaCl em nenhuma dose ou frequência, no entanto, no tratamento com sacarose tTmax foi aumentado, mas apenas na dose de 150 mOsm/l, na frequência de 64

TABELA IV- Médias de tTmax (tempo para a tensão atingir seu valor máximo), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências, e submetido a incrementos de osmolalidade do fluido nutriente (Krebs-Henseleit). Incrementos de osmolalidade (doses): 0,50,100,150 e 200 mOsm/l por adição de NaCl ou de Sacarose. Frequências: 4,16 e 64 est./min. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

	NaCl			SACAROSE		
	(n=6)			(n=6)		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
00	36,0 (0,52)	36,0 (0,00)	36,0 (0,52)	35,1 (0,59)	34,9 (0,74)	35,1 (0,59)
50	35,3 (0,67)	35,7 (0,33)	34,3 (0,80)	34,3 (0,81)	35,4 (0,57)	34,6 (0,72)
100	35,0 (0,68)	34,7 (0,84)	34,7 (0,84)	35,1 (1,06)	34,6 (0,72)	33,4 (1,13)
150	37,3 (0,84)	36,0 (0,00)	34,7 (1,33)	36,0 (0,87)	35,7 (0,68)	38,3 (0,81)
200	36,7 (0,67)	37,3 (0,84)	35,7 (0,80)	37,1 (0,74)	37,1 (1,14)	37,1 (1,14)

(a)- estímulos/minuto; (b)- incrementos produzidos na osmolalidade da solução nutriente em mOsm/l; (n)- número de experimentos.

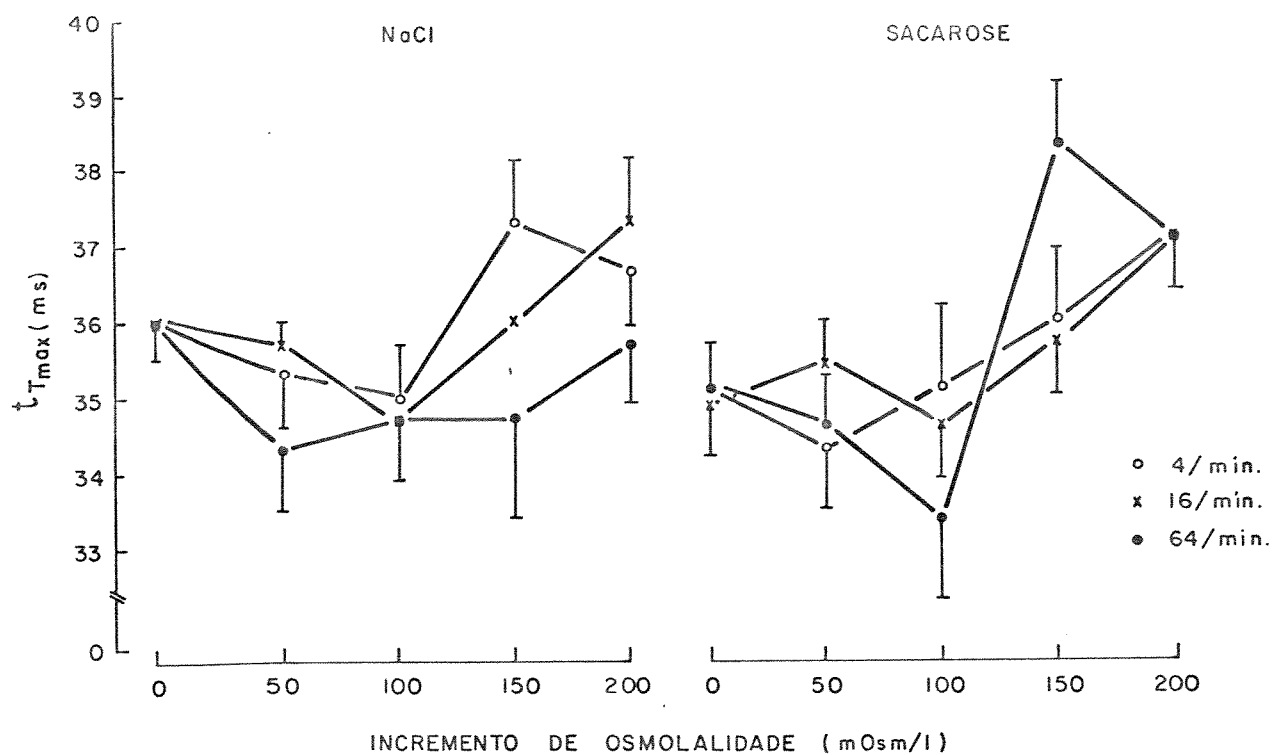


Fig.06- Tempo para a tensão atingir seu valor máximo (t_{Tmax}) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências e sob efeito de soluções tornadas hiperosmóticas pelo incremento de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução nutriente por adição de NaCl ou Sacarose. Ordenadas: t_{Tmax} (ms). Abscissas: incremento produzido na osmolalidade do fluido nutriente (mOsm/l adicionados). Simbologia: (o)- 4, (x)- 16 e (•)- 64 est./min.

QUADRO 04- a) resultado da análise de variância trifatorial para tTmax (tempo para a tensão atingir o valor máximo), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, considerando três fontes de variação: Frequências (4, 16 e 64 est./min.), doses (0,50,100,150 e 200 mOsm/l) e tratamentos (NaCl e Sacarose).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
FREQUÊNCIA (A)	2	1,1323	NS
DOSE (B)	4	7,2010	***
TRATAMENTO (C)	1	0,9205	NS
A X B	8	0,6350	NS
A X C	2	1,0660	NS
B X C	4	0,8514	NS
A X B X C	8	1,5898	NS
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste t de "Student" para comparação dos contrastes (dose 00 x incrementos de osmolalidade)

FREQUÊNCIAS (a)	4	NaCl		4	SACAROSE	
		16	64		16	64
DOSES (b)						
50	NS	NS	NS	NS	NS	NS
100	NS	NS	NS	NS	NS	NS
150	NS	NS	NS	NS	NS	**
200	NS	NS	NS	NS	NS	NS

QUADRO 05- Efeito simples da dose sobre tTmax para os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	GL	F	
NaCl	4	2,3234	NS
SACAROSE	4	5,7290	***
RESÍDUO	150		

NS- não significativo; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$;

est./min. ($p < 0,01$).

c) não foram observadas alterações significativas em nenhuma das interações analisadas, considerando o conjunto de frequências, doses e tratamentos.

4.1.3 Análise de tD (tempo total de duração da contração)

Na tabela V encontram-se as médias de tD obtidas do tratamento do tecido auricular esquerdo isolado de rato, com soluções hiperosmóticas (incrementos de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução controle) de NaCl e de sacarose e sob estimulação elétrica nas frequências de 4, 16 e 64 est./min. Estes resultados estão ilustrados na figura 07.

Nos quadros 06, 07 e 08 estão apresentados os resultados da análise de variância para tD e dos testes "t" de Student realizados para comparação de contrastes. Desta análise os seguintes resultados conclusivos foram obtidos:

a) Ambos os tratamentos (NaCl e sacarose) aumentaram tD de modo dose-dependente ($p < 0,01$);

b) O valor de tD foi influenciado pela frequência ($p < 0,05$), pela dose ($p < 0,01$) e pelo tratamento ($p < 0,05$);

TABELA V- Médias de tD (tempo total de duração da contração) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências, e submetido a vários incrementos de osmolalidade (doses) do fluido nutriente. Doses: 0,50,100,150 e 200 mOsm/l por adição de NaCl ou de Sacarose. Frequências: 4,16 e 64 est./min. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

	NaCl (n=6)			SACAROSE (n=6)		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
00	92,7 (2,67)	91,3 (2,17)	91,0 (4,37)	91,1 (1,62)	86,9 (1,89)	91,4 (2,68)
50	90,3 (0,80)	85,3 (1,33)	84,3 (3,59)	91,4 (2,38)	87,1 (2,22)	87,4 (2,21)
100	92,0 (1,79)	87,7 (1,50)	86,3 (2,22)	98,9 (3,88)	100,9 (4,18)	92,9 (2,30)
150	110,7 (2,23)	104,7 (1,23)	93,7 (5,17)	104,6 (3,08)	104,6 (3,85)	106,9 (2,86)
200	113,7 (2,55)	116,0 (4,73)	99,3 (4,05)	111,1 (5,69)	110,9 (3,97)	117,7 (6,75)

(a)- frequência em est./min.; (b)- incrementos produzidos na osmolalidade da solução nutriente em mOsm/l; (n)- número de experimentos.

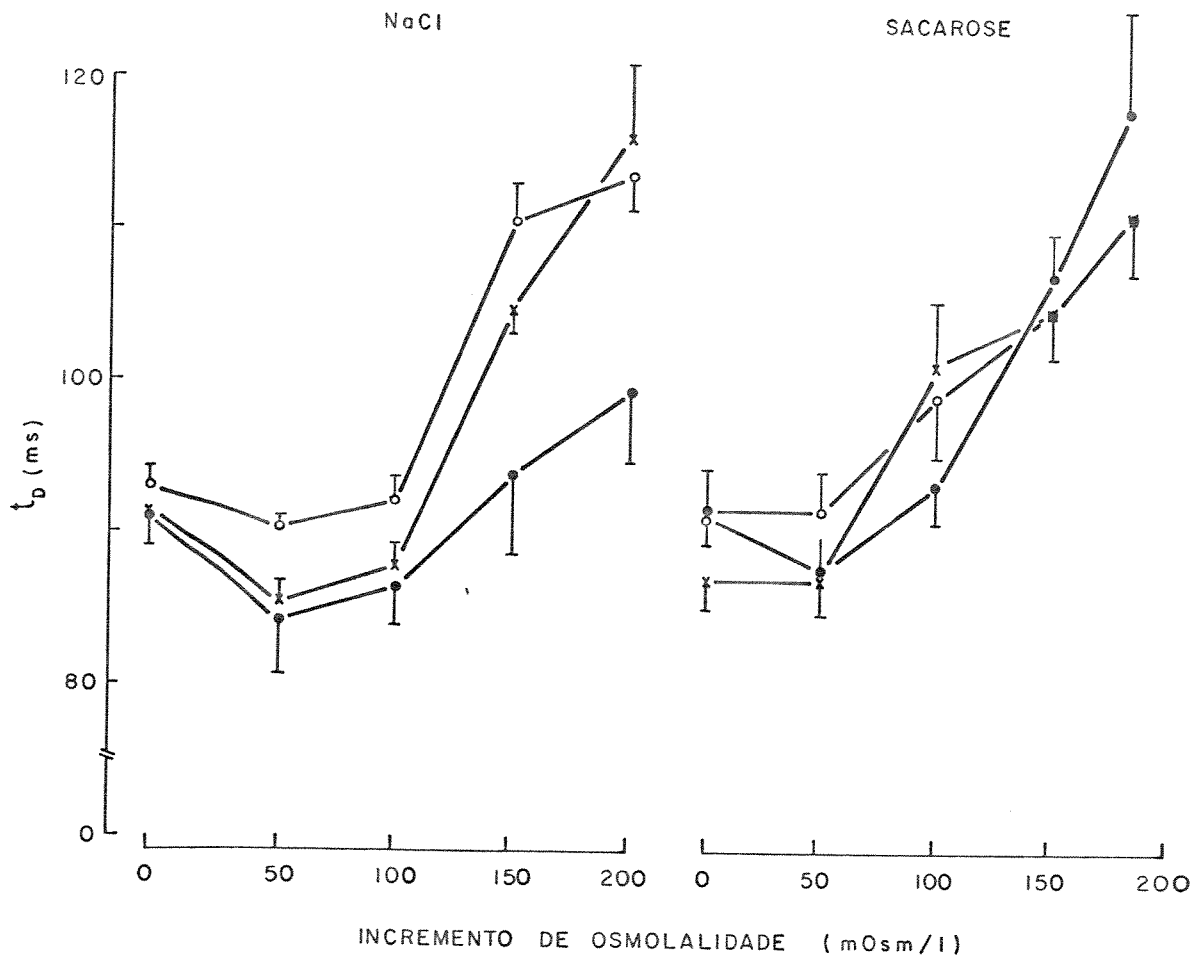


Fig.07- Tempo total de duração da contração (t_D) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências e sob efeito de soluções tornadas hiperosmóticas pelo incremento de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução nutriente por adição de NaCl ou Sacarose. Ordenadas: t_D (ms). Abscissas: incremento produzido na osmolalidade do fluido nutriente (mOsm/l adicionados). Simbologia: (o)- 4, (x)- 16 e (•)- 64 est./min.

QUADRO 06- a) resultado da análise de variância trifatorial para tD (tempo total de duração da contração), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, considerando três fontes de variação: Frequências (4, 16 e 64 est./min.), doses (0,50,100,150 e 200 mOsm/l) e tratamentos (NaCl e Sacarose).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
FREQUÊNCIA (A)	2	4,47	*
DOSE (B)	4	43,25	***
TRATAMENTO (C)	1	5,16	*
A X B	8	0,49	NS
A X C	2	3,75	*
B X C	4	1,94	NS
A X B X C	8	1,84	NS
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste t de "Student" para comparação dos contrastes (dose 00 x incrementos de osmolalidade)

	NaCl			SACAROSE		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
50	NS	*	NS	NS	NS	NS
100	NS	NS	NS	NS	**	NS
150	***	***	NS	***	**	**
200	***	***	NS	**	***	**

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$; (a)- estímulos/minuto; (b)- mOsm/l.

QUADRO 07- Efeito simples da dose sobre tD para os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	4	23,37 ***
SACAROSE	4	21,83 ***
Resíduo	150	

QUADRO 08- Efeito simples da frequência sobre tD para os diferentes tratamentos

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	2	8,20 ***
SACAROSE	2	0,03 NS
Resíduo	150	

NS- não significativo; ***- $p < 0,001$

c) t_D foi alterado de modo frequência dependente apenas no tratamento com NaCl ($p < 0,01$). Observou-se aumento de t_D nas frequências de 4 e 16 est./min., nas doses de 150 e 200 mOsm/l ($p < 0,001$). No tratamento com sacarose t_D aumentou em todas as frequências, nas doses de 150 e 200 mOsm/l ($p < 0,01$).

4.1.4 Análise de dT/dt_{max} (máxima derivada temporal de desenvolvimento de tensão).

A dT/dt_{max} representa a máxima "velocidade" de desenvolvimento de tensão durante a fase de contração do tecido cardíaco em estudo.

Na tabela VI encontram-se médias de dT/dt_{max} obtidas do tratamento do tecido auricular esquerdo isolado de rato, com soluções hiperosmóticas (incrementos de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução controle) de NaCl e de sacarose e sob estimulação elétrica nas frequências de 4, 16 e 64 est./min. Estes resultados estão ilustrados na figura 08.

Nos quadros 09, 10 e 11 estão apresentados os resultados das análises de variância para dT/dt_{max} e dos testes "t" de Student, realizados para comparação dos contrastes. Desta análise os seguintes resultados conclusivos foram obtidos:

a) Os valores de dT/dt_{max} foram diferentes entre frequências ($p <$

TABELA VI- Médias de dT/dT_{max} ("velocidade" máxima de desenvolvimento de tensão) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências, e submetido a vários incrementos de osmolalidade (doses) do fluido nutriente. Doses: 0,50,100,150 e 200 mOsm/l por adição de NaCl ou de Sacarose. Frequências: 4,16 e 64 est./min. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

FREQUÊNCIAS (a)	NaCl (n=6)			SACAROSE (n=6)		
	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
00	37,3 (1,35)	30,9 (2,43)	23,5 (2,70)	40,9 (2,36)	32,0 (1,97)	25,8 (2,05)
50	36,7 (1,890)	26,1 (2,09)	19,2 (1,65)	42,1 (2,65)	36,6 (2,31)	28,6 (2,16)
100	37,3 (1,35)	26,8 (1,97)	16,5 (2,25)	45,5 (3,35)	43,4 (2,69)	28,1 (1,97)
150	36,3 (1,35)	28,3 (1,74)	14,9 (1,58)	42,5 (3,25)	41,6 (3,20)	31,5 (1,77)
200	32,5 (1,74)	25,6 (1,65)	14,4 (2,30)	34,1 (2,67)	36,8 (2,24)	29,3 (2,26)

(a)- frequência em est./min.;(b)- incrementos produzidos na osmolalidade da solução nutriente em mOsm/l; (n)- número de experimentos.

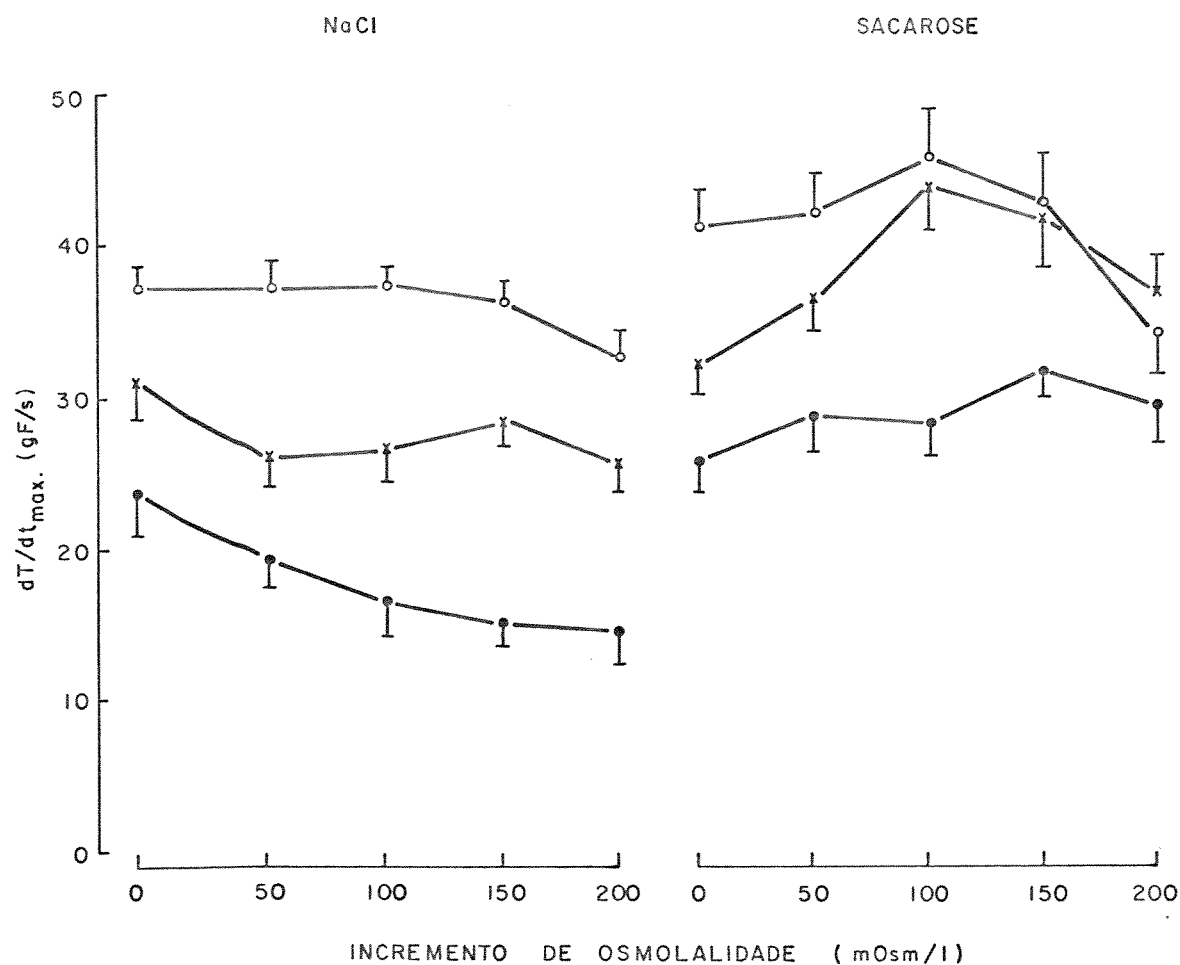


Fig.08- Valor máximo da derivada temporal de desenvolvimento de tensão (dT/dt_{max}) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências e sob efeito de soluções tornadas hiperosmóticas pelo incremento de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução nutriente por adição de NaCl ou Sacarose. Ordenadas: dT/dt_{max} (gf/s). Abscissas: incremento produzido na osmolalidade do fluido nutriente (mOsm/l adicionados). Simbologia: (o) - 4, (x) - 16 e (*) - 64 est./min.

QUADRO 09- a) resultado da análise de variância trifatorial para dT/dtmax (máxima taxa de desenvolvimento de tensão), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, considerando três fontes de variação: Frequências (4, 16 e 64 est./min.), doses (0,50,100,150 e 200 mOsm/l) e tratamentos (NaCl e Sacarose).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
FREQUENCIA (A)	2	102,47	***
DOSE (B)	4	2,67	*
TRATAMENTO (C)	1	87,81	***
A X B	8	0,97	NS
A X C	2	6,24	**
B X C	4	4,11	**
A X B X C	8	1,06	NS
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste t de "Student" para comparação dos contrastes (dose 00 x incrementos de osmolalidade)

	NaCl.			SACAROSE		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
50	NS	NS	NS	NS	NS	NS
100	NS	NS	NS	NS	**	NS
150	NS	NS	*	NS	NS	NS
200	NS	NS	*	NS	NS	NS

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; (a) - estímulos/minuto; (b) - mOsm/l.

QUADRO 10- Efeito simples da dose sobre dT/dtmax para os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	4	2,79 *
SACAROSE	4	3,98 **
Resíduo	150	

QUADRO 11- Efeito simples da frequência sobre dT/dtmax para os diferentes tratamentos

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	2	74,15 ***
SACAROSE	2	34,55 ***
Resíduo	150	

*- $p < 0,05$; **- $p < 0.01$; ***- $p < 0,001$

0,001), entre tratamentos ($p < 0,001$) e entre doses ($p < 0,05$);

b) o tratamento com NaCl reduziu dT/dt_{max} de modo dose dependente ($p < 0,05$) na frequência de 64 est./min., sendo significativo nas doses de 150 e 200 mOsm/l ($p < 0,05$);

c) o tratamento com sacarose aumentou a dT/dt_{max} de modo dose dependente ($p < 0,01$), significativo apenas na frequência de 16 est./min.;

d) Os valores de dT/dt_{max} foram dependentes da frequência em ambos os tratamentos ($p < 0,01$).

4.1.5 Análise de dT/dt_{min} (mínima derivada temporal de desenvolvimento de tensão).

Na tabela VII encontram-se médias de dT/dt_{min} obtidas do tratamento do tecido auricular esquerdo isolado de rato, com soluções hiperosmóticas (incrementos de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução controle) de NaCl e de sacarose e sob estimulação elétrica nas frequências de 4, 16 e 64 est./min. Estes resultados estão ilustrados na figura 09.

Nos quadros 12, 13 e 14 estão apresentados os resultados da análise de variância para dT/dt_{min} e dos testes "t" de Student, realizados para comparação dos contrastes. Desta análise os seguintes resultados conclusivos foram obtidos:

TABELA VII- Médias de dt/dt_{min} ("velocidade" mínima de desenvolvimento de tensão) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências, e submetido a vários incrementos de osmolalidade (doses) do fluido nutriente. Doses: 0,50,100,150 e 200 mOsm/l por adição de NaCl ou de Sacarose. Frequências: 4,16 e 64 est./min. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

FREQUÊNCIAS (a)	NaCl (n=6)			SACAROSE (n=6)		
	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
00	25,6 (1,74)	20,7 (1,63)	16,0 (2,02)	23,7 (1,05)	20,3 (1,35)	15,6 (1,33)
50	22,4 (1,65)	16,5 (2,09)	12,8 (1,65)	24,5 (2,57)	21,9 (3,35)	18,7 (1,53)
100	21,3 (1,35)	16,5 (1,74)	11,2 (1,37)	24,0 (1,09)	25,6 (0,00)	16,8 (2,33)
150	19,2 (0,83)	16,0 (1,43)	9,1 (1,28)	21,3 (1,07)	22,9 (1,28)	19,2 (0,00)
200	14,9 (1,35)	14,9 (1,35)	7,5 (1,35)	16,5 (1,28)	19,7 (1,28)	16,5 (0,53)

(a)- frequência em est./min.; (b)- incrementos produzidos na osmolalidade da solução nutriente em mOsm/l; (n)- número de experimentos.

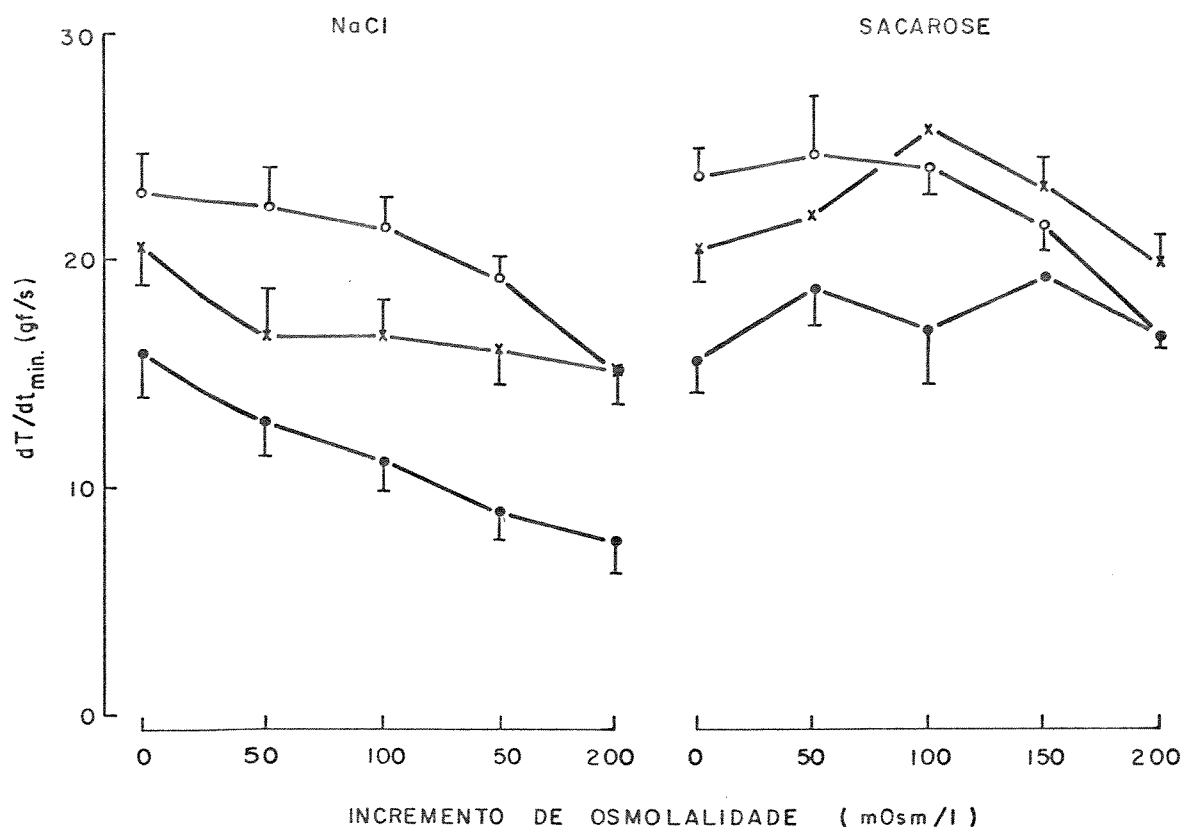


Fig.09- Valor mínimo da derivada temporal de desenvolvimento de tensão (dT/dt_{min}) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em diferentes frequências e sob efeito de soluções tornadas hiperosmóticas pelo incremento de 50, 100, 150 e 200 mOsm/l na osmolalidade da solução nutriente por adição de NaCl ou Sacarose. Ordenadas: dT/dt_{min} (gf/s). Abscissas: incremento produzido na osmolalidade do fluido nutriente (mOsm/l adicionados). Simbologia: (o) - 4, (x) - 16 e (•) - 64 est./min.

QUADRO 12- a) resultado da análise de variância trifatorial para dT/dt_{min} ("velocidade" mínima de desenvolvimento de tensão), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, considerando três fontes de variação: Frequências (4, 16 e 64 est./min.), doses (0,50,100,150 e 200 mOsm/l) e tratamentos (NaCl e Sacarose).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
FREQUENCIA (A)	2	50,71	***
DOSE (B)	4	9,46	***
TRATAMENTO (C)	1	57,62	***
A X B	8	1,39	NS
A X C	2	4,88	**
B X C	4	3,94	**
A X B X C	8	1,06	NS
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste t de "Student" para comparação dos contrastes (dose 00 x incrementos de osmolalidade)

	NaCl			SACAROSE		
FREQUÊNCIAS (a)	4	16	64	4	16	64
DOSES (b)						
50	NS	NS	NS	NS	NS	NS
100	NS	NS	NS	NS	**	NS
150	NS	NS	*	NS	NS	*
200	**	*	*	**	NS	NS

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$; (a)- estímulos/minuto; (b)- mOsm/l.

QUADRO 13- Efeito simples da dose sobre dT/dt_{min} para os diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	4	9,34 ***
SACAROSE	4	4,05 **
Resíduo	150	

QUADRO 14- Efeito simples da frequência sobre dT/dt_{min} para os diferentes tratamentos

TRATAMENTOS	GL	F
NaCl	2	40,69 ***
SACAROSE	2	14,93 ***
Resíduo	150	

** - $p < 0.01$; *** - $p < 0,001$

a) Os valores de dT/dt_{min} foram significativamente diferentes entre frequências ($p < 0,001$), tratamentos ($p < 0,001$) e doses ($p < 0,05$);

b) o tratamento com NaCl diminuiu a dT/dt_{min} na dose 150 mOsm/l, na frequência de 64 est./min., enquanto que na dose 200 mOsm/l reduziu dT/dt_{min} em todas as frequências ($p < 0,05$);

c) o tratamento com sacarose aumentou a dT/dt_{min} ($p < 0,001$), significante na frequência de 4 est./min. e dose 200 mOsm/l ($p < 0,01$), frequência de 16 est./min., dose 100 mOsm/l ($p < 0,01$) e frequência de 64 est./min., dose 150 mOsm/l ($p < 0,05$); e

d) os valores de dT/dt_{min} foram dependentes da frequência estimulatória em ambos os tratamentos ($p < 0,001$).

4.2 Relação força-frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato, na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose.

Nas tabelas VIII, IX, X e XI encontram-se médias de T_{max} , tT_{max} , tD e dT/dt_{max} , respectivamente, obtidas em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 est./min. para o parâmetro T_{max} e nas frequências de 8, 16, 32, 64, 128 e 256 est./min. para os demais parâmetros com o tecido cardíaco sob efeito de soluções hiperosmóti-

TABELA VIII- Médias de Tmax (tensão máxima desenvolvida), expressas em gf, em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em 9 diferentes frequências (1,2,4,8,16,32,64,128 e 256 est./min.) na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
FREQUÊNCIA (est./min.)			
1	1,06 (0,08)	1,02 (0,06)	1,11 (0,10)
2	1,03 (0,09)	0,99 (0,06)	1,10 (0,10)
4	1,00 (0,10)	0,99 (0,06)	1,11 (0,10)
8	0,94 (0,11)	1,00 (0,070)	1,12 (0,10)
16	0,87 (0,12)	0,98 (0,06)	1,14 (0,11)
32	0,75 (0,11)	0,82 (0,05)	1,13 (0,09)
64	0,63 (0,09)	0,50 (0,03)	0,99 (0,07)
128	0,50 (0,05)	0,32 (0,02)	0,70 (0,04)
256	0,37 (0,03)	0,25 (0,02)	0,50 (0,04)

(n)- número de experimentos

TABELA IX- Médias de tTmax (tempo para a tensão atingir seu valor máximo), expressas em ms, em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em 6 diferentes frequências (8,16,32,64,128 e 256 est./min.) na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
FREQUÊNCIA (est./min.)			
8	36,7 (1,05)	37,5 (1,12)	39,2 (1,54)
16	36,7 (1,05)	36,7 (1,05)	38,3 (1,05)
32	35,8 (0,83)	38,3 (1,05)	38,3 (1,05)
64	35,0 (0,00)	37,5 (1,12)	36,7 (1,05)
128	36,7 (1,05)	36,7 (1,05)	37,5 (1,12)
256	35,8 (0,83)	35,0 (1,29)	37,5 (1,12)

(n)- número de experimentos

TABELA X- Médias de tD (tempo total de duração da contração), expressas em ms, em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em 6 diferentes frequências (8,16,32,64,128 e 256 est./min.) na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
FREQUENCIA (est./min.)			
8	106,7 (3,57)	112,5 (4,23)	125,0 (6,58)
16	100,8 (3,27)	114,2 (4,55)	122,5 (4,42)
32	99,2 (2,01)	115,0 (4,08)	120,8 (5,390)
64	99,2 (1,54)	103,3 (2,47)	119,2 (4,55)
128	95,8 (2,01)	96,7 (2,47)	115,8 (4,55)
256	94,2 (2,39)	90,0 (2,58)	109,2 (4,36)

(n) - número de experimentos

TABELA XI- Médias de dT/dt_{max} (máxima derivada temporal de desenvolvimento de tensão), expressas em gf/s, em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente em 6 diferentes frequências (8, 16, 32, 64, 128 e 256 est./min.) na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
FREQUÊNCIA (est./min.)			
8	25,6 (2,58)	21,5 (1,31)	28,9 (3,05)
16	23,4 (2,80)	20,8 (1,11)	29,3 (3,43)
32	21,1 (3,40)	17,4 (1,12)	28,9 (3,34)
64	18,0 (2,51)	11,0 (0,86)	23,2 (2,38)
128	13,8 (1,49)	6,8 (1,01)	16,2 (2,37)
256	10,5 (0,91)	4,32 (0,78)	10,5 (2,04)

(n)- número de experimentos

cas de NaCl e de sacarose e de solução controle (Krebs-Henseleit), em preparações pré-tratadas com fenoxibenzamina e propranolol. Estes dados estão ilustrados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Nos quadros de 15 a 18 estão ilustrados os resultados das análises de variância monofatoriais para estudo de todos os parâmetros da contração do tecido auricular na presença da solução controle. Nos quadros de 19 a 24 estão ilustrados os resultados de análises bifatoriais realizadas para comparação das curvas de cada parâmetro em função da frequência, obtidas na solução controle e nas soluções hiperosmóticas. Ainda nestes mesmos quadros estão apresentados os resultados de testes "t" de Student para comparação de contrastes (controle x solução hiperosmótica).

Os principais resultados conclusivos destas análises foram os seguintes:

a) Na presença da solução controle (Krebs-Henseleit), houve uma relação inversa "parâmetro" x frequência para T_{max} e dT/dt_{max} (vide quadros 15 e 16). No entanto, tT_{max} e tD não sofreram variação com a frequência;

b) O bloqueio de receptores adrenérgicos e colinérgicos não modificou a forma da curva "parâmetro"-frequência (vide quadros de 15 a 18), no entanto produziu elevação de tT_{max} com redução de dT/dt_{max} (vide quadros 16 e 18 e figs. 11 e 13), na presença da solução controle;

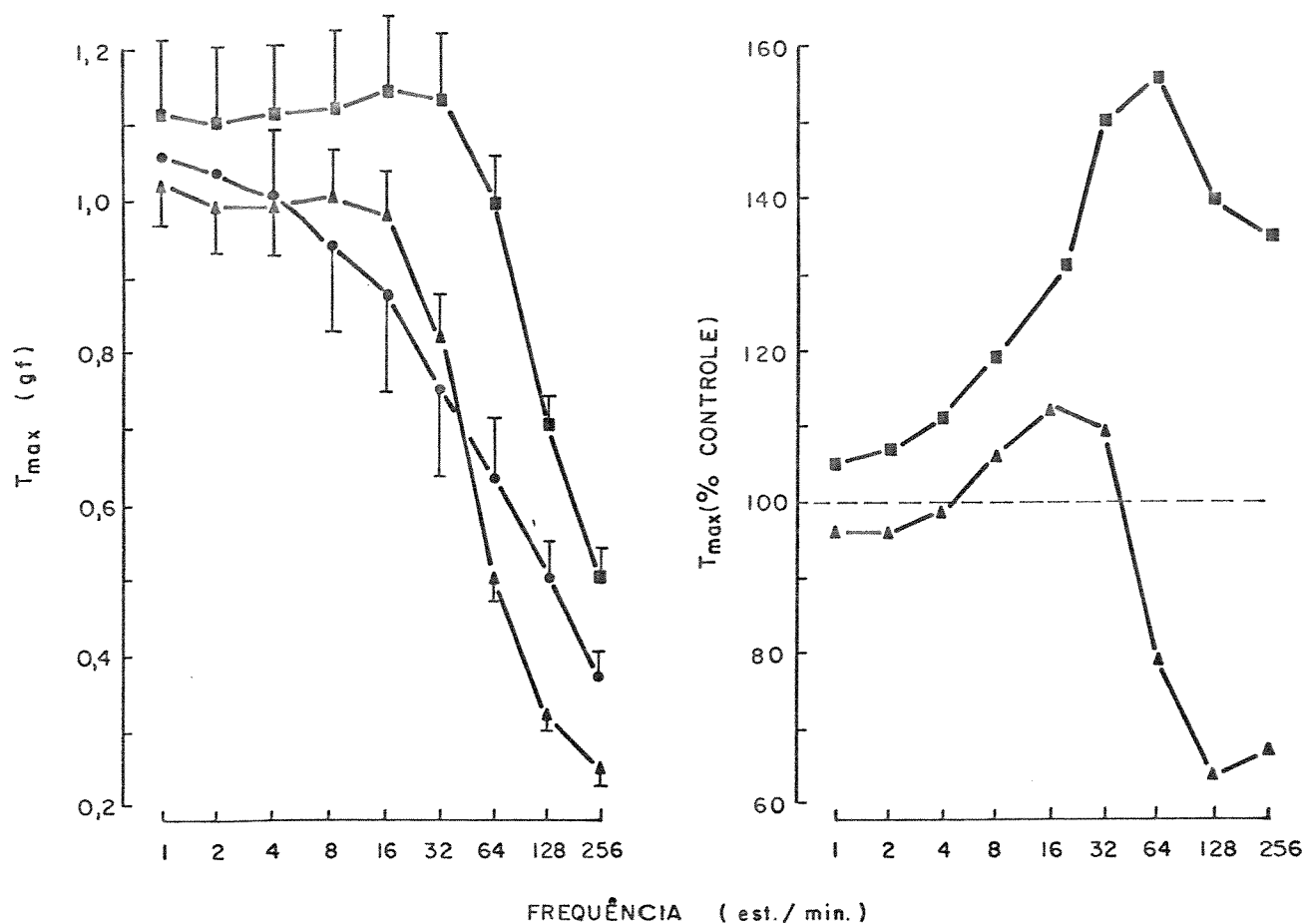


Fig.10- Relação T_{max} (tensão máxima desenvolvida) - frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato, na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Ordenadas: A- T_{max} (gf); B- T_{max} (% controle). Abscissas: frequência (est./min.). Simbologia: (●)- controle; (▲)- NaCl; (■)- Sacarose.

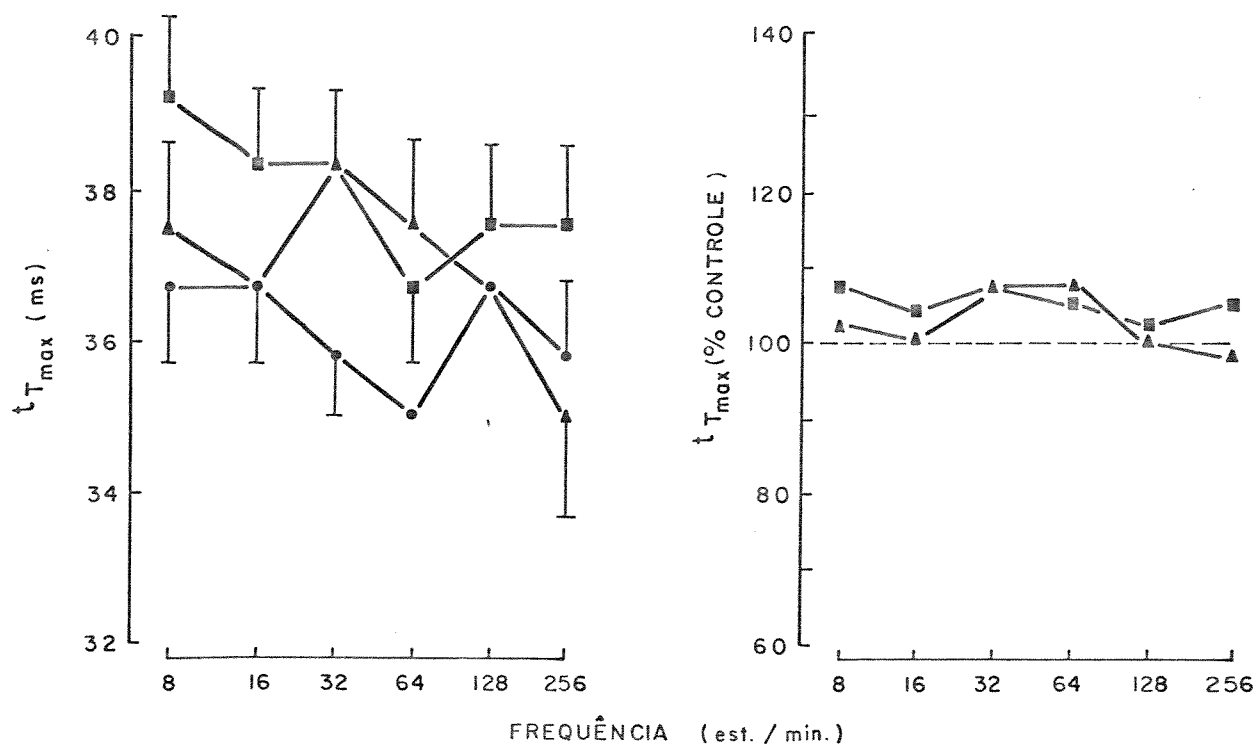


Fig.11- Relação $t_{T_{max}}$ (tempo para a tensão atingir seu valor máximo) - frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato, na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Ordenadas: A- $t_{T_{max}}$ (ms); B- $t_{T_{max}}$ (% controle). Abscissas: frequência (est./min.). Simbologia: (•)- controle; (▲)- NaCl; (■)- Sacarose.

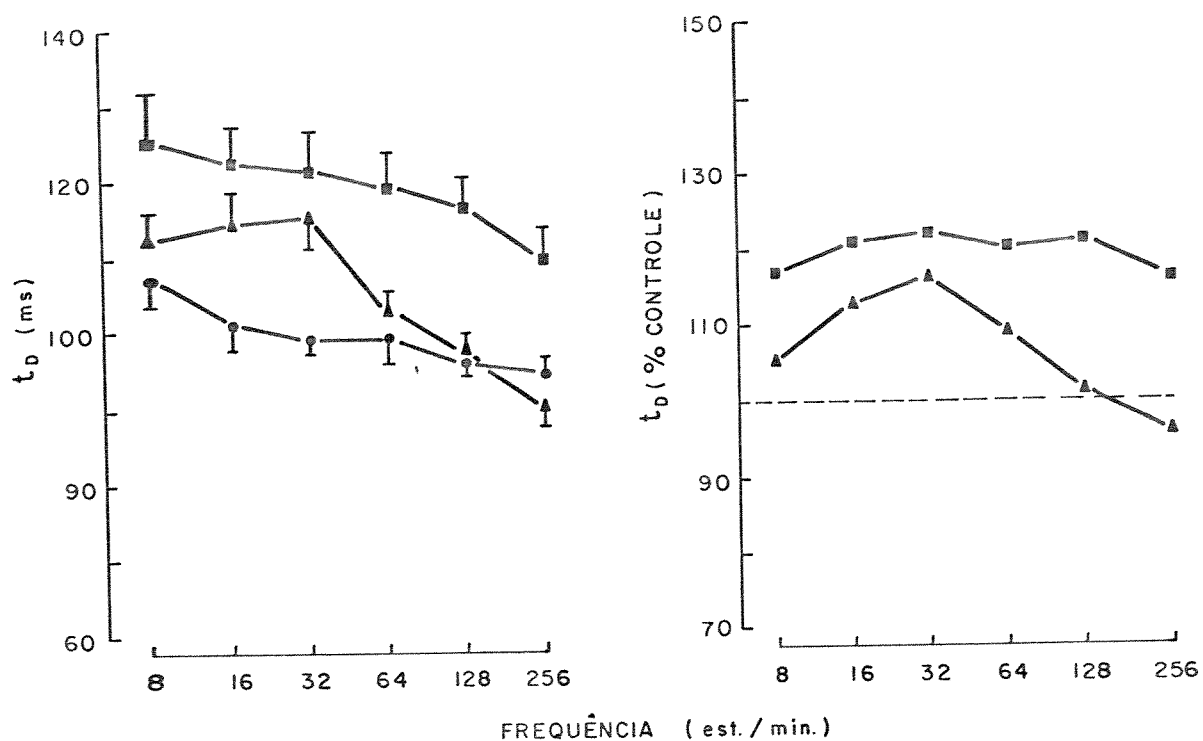


Fig.12- Relação tD (tempo total de duração da contração) - frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato, na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Ordenadas: A- tD (ms); B- tD (% controle). Abscissas: frequência (est./min.). Simbologia: (●)- controle; (▲)- NaCl; (■)- Sacarose.

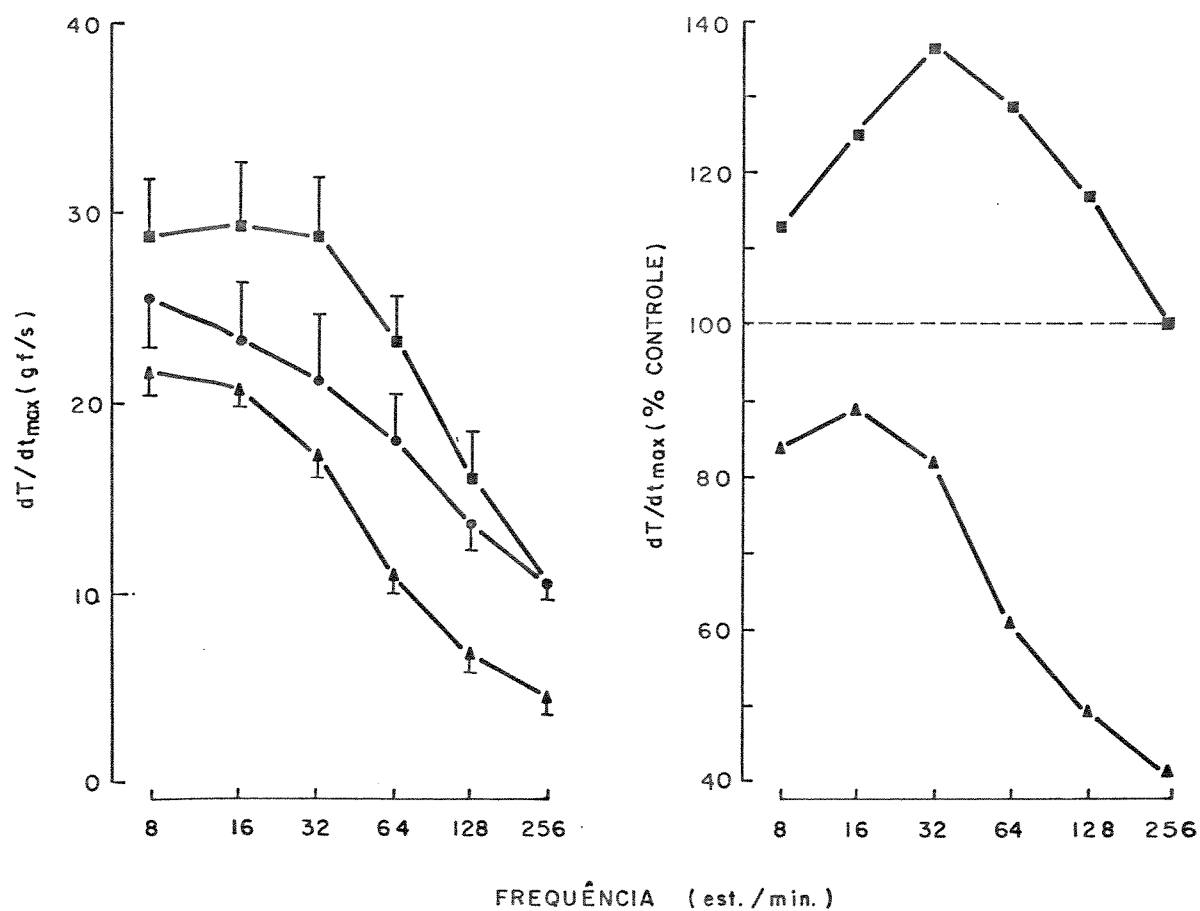


Fig.13- Relação dT/dt_{max} (máxima derivada temporal de desenvolvimento de tensão) - frequência em tecido auricular esquerdo isolado de rato, na presença de soluções hiperosmóticas de NaCl e de Sacarose, e de solução de Krebs-Henseleit normal (controle). Ordenadas: A- dT/dt_{max} (gf/s); B- dT/dt_{max} (% controle). Abscissas: frequência (est./min.). Simbologia: (•)- controle; (▲)- NaCl; (■)- Sacarose.

QUADRO 15- Resultado da análise de variância bifatorial, efetuada para verificar a influência do pré-tratamento "in vitro" com fenoxibenzamina e propranolol (tratamentos) e da frequência estimulatória sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido atrial esquerdo isolado de rato, na presença de solução de Krebs-Henseleit (CONTROLE).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTO (A)	1	1,485	NS
FREQUÊNCIA (B)	8	18,656	***
A X B	8	0,092	NS
RESÍDUO	90		

QUADRO 16- resultado da análise de variância bifatorial, efetuada para verificar a influência do pré-tratamento "in vitro" com fenoxibenzamina e propranolol (tratamentos) e frequência estimulatória sobre tTmax (tempo para a tensão atingir seu máximo valor), em tecido atrial esquerdo isolado de rato, na presença de solução de Krebs-Henseleit (CONTROLE).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTO (A)	1	42,215	***
FREQUÊNCIA (B)	5	0,441	NS
A X B	5	0,699	NS
RESÍDUO	60		

NS- não significativo; ***- $p < 0,001$

QUADRO 17- resultado da análise de variância bifatorial, efetuada para verificar a influência do pré-tratamento "in vitro" com fenoxibenzamina e propranolol (tratamentos) e da frequência estimulatória sobre tD (tempo total de duração da contração) em tecido atrial esquerdo isolado de rato, na presença de solução de Krebs-Henseleit (CONTROLE).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTO (A)	1	0,326	NS
FREQUÊNCIA (B)	5	1,340	NS
A X B	5	0,961	NS
RESÍDUO	60		

QUADRO 18- resultado da análise de variância bifatorial, efetuada para verificar a influência do pré-tratamento "in vitro" com fenoxibenzamina e propranolol (tratamento) e da frequência estimulatória sobre dT/dtmax (máxima derivada temporal de desenvolvimento de tensão), em tecido atrial esquerdo isolado de rato, na presença de solução de Krebs-Henseleit (CONTROLE).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTO (A)	1	4,353	*
FREQUÊNCIA (B)	5	11,309	**
A X B	5	1,066	NS
RESÍDUO	60		

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$.

QUADRO 19- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de NaCl com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação Tmax (tensão máxima desenvolvida) - frequência estimulatória, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
TRATAMENTOS (A) (NaCl, controle)	1	0,588 NS
FREQUENCIA (B)	8	26,676 ***
A X B	8	1,618 NS
(A,B)	17	
RESÍDUO	90	
TOTAL	107	

b) teste t de "Student" para comparação entre os contrastes de Tmax (NaCl x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	1	2	4	8	16	32	64	128	256
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**

NS- não significativo; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 20- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de NaCl com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação tTmax (tempo para a tensão atingir seu valor máximo) - frequência estimulatória, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
TRATAMENTOS (A) (NaCl, controle)	1	2,045 NS
FREQUÊNCIA (B)	5	0,773 NS
A X B	5	0,954 NS
(A,B)	11	
RESÍDUO	60	
TOTAL	71	

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de tTmax (NaCl x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	8	16	32	64	128	256
	NS	NS	NS	*	NS	NS

NS- não significativo; *- $P < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 21- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de NaCl com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação tD (tempo total de duração da contração) - frequência de estimulação elétrica, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTOS (A) (NaCl, controle)	1	1,668	NS
FREQUÊNCIA (B)	5	0,970	NS
A X B	5	6,768	***
(A,B)	11		
RESÍDUO	60		
TOTAL	71		

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de tD (NaCl x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	8	16	32	64	128	256
	NS	*	**	NS	NS	NS

NS- não significativo; *- $P < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 22- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de NaCl com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação dT/dt_{max} (máxima derivada temporal de desenvolvimento de tensão) - frequência estimulatória, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
TRATAMENTOS (A) (NaCl, controle)	1	22,303 ***
FREQUÊNCIA (B)	5	24,318 ***
A X B	5	0,503 NS
(A,B)	11	
RESÍDUO	60	
TOTAL	71	

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de dT/dt_{max} (NaCl x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	8	16	32	64	128	256
	NS	NS	NS	*	**	***

NS- não significativo; *- $P < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 23- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de sacarose com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação Tmax (tensão máxima desenvolvida) - frequência estimulatória, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
TRATAMENTOS (A) (sacarose, controle)	1	21,042 ***
FREQUÊNCIA (B)	8	13,354 ***
A X B	8	0,937 NS
(A,B)	17	
RESÍDUO	90	
TOTAL	107	

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de Tmax (SACAROSE x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	1	2	4	8	16	32	64	128	256
	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	*	*

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 24- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de sacarose com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre a relação tTmax (tempo para a tensão atingir seu valor máximo) - frequência estimulatória, em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
TRATAMENTOS (A) (sacarose, controle)	1	9,086 **
FREQUENCIA (B)	5	0,957 NS
A X B	5	0,183 NS
(A,B)	11	
RESÍDUO	60	
TOTAL	71	

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de Tmax (SACAROSE x CONTROLE) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

FREQUÊNCIAS (est./min.)	8	16	32	64	128	256
	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS- não significativo; **- $p < 0,01$.

c) a solução hiperosmótica de NaCl não afetou a relação Tmax-frequência. Na análise de contrastes, contudo, observou-se redução de Tmax ($p < 0,01$) nas frequências de 128 e 256 est./min. (vide quadro 17, fig.10);

d) a solução hiperosmótica de NaCl não afetou a relação tTmax-frequência. A análise de contrastes revelou contudo a existência de aumento de tTmax na frequência de 64 est./min. (vide quadro 18, fig.11);

e) a relação tD-frequência foi modificada pela solução hiperosmótica de NaCl, fato que está indicado pela presença de interação significativa ($p < 0,001$) entre frequências e tratamentos (vide quadro 19). A análise de contrastes revelou aumento de tD nas frequências 16 e 32 est./min., fazendo com que a forma da curva tD x frequência fosse estatisticamente diferente daquela obtida na solução controle (vide quadro 19, fig. 12);

f) embora a forma da curva dT/dtmax-frequência não tenha sido alterada, os valores de dT/dtmax mostraram-se reduzidos ($p < 0,001$) no conjunto das frequências (vide quadro 20, fig.13). A análise de contrastes mostrou que houve redução significativa de dT/dtmax nas frequências de 64 ($p < 0,05$), 128 ($p < 0,01$) e 256 ($p < 0,001$) est./min.;

g) a solução hiperosmótica de sacarose não alterou a forma da curva "parâmetro"-frequência, mas elevou o valor de todos os parâmetros da

contração, no conjunto das frequências estudadas (vide quadros de 21 a 24 e figuras de 10 a 13);

h) por comparação dos contrastes observou-se que a solução hiperosmótica de sacarose elevou T_{max} nas frequências de 32, 64, 128 e 256 est./min. e t_D em todas as frequências utilizadas.

4.3 Curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas sobre T_{max} .

4.3.1 Efeito das soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose.

Encontram-se na Tabela XII e ilustrados na figura 14, os valores médios de T_{max} (valores absolutos) obtidos da aplicação rápida e mantida das soluções hiperosmóticas ($\Delta mOsm/l=150$) de NaCl e de sacarose ao tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado na frequência de 64 est./min. Na Tabela XIII, ilustrados na Fig. 15, os mesmos dados são apresentados como porcentagem do valor inicial de T_{max} . Da análise estatística efetuada (Quadros 25 e 26) concluiu-se que:

a) A solução hiperosmótica de NaCl produziu inicialmente uma redução de T_{max} ($p<0,001$) para um valor cerca de 50% do seu valor inicial, atingindo um valor mínimo em 1,5 minutos. Em seguida, iniciou-se uma fase de recuperação da tensão desenvolvida pelo tecido, na qual T_{max} atingiu (em $t=10min.$) um valor máximo que não diferiu do valor con-

TABELA XII- Curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min. Os dados tabelados são médias dos valores absolutos de Tmax, registrados durante 30 minutos em resposta à aplicação rápida e mantida (em t=0min.) de soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose e da solução de Krebs-Henseleit (controle). Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
TEMPO (min.)			
0,0	0,85 (0,08)	0,76 (0,09)	0,82 (0,07)
0,5	0,85 (0,08)	0,52 (0,07)	0,80 (0,06)
1,0	0,86 (0,07)	0,41 (0,04)	0,78 (0,06)
1,5	0,86 (0,08)	0,39 (0,04)	0,82 (0,06)
2,0	0,86 (0,08)	0,44 (0,05)	0,87 (0,05)
2,5	0,86 (0,08)	0,49 (0,05)	0,88 (0,05)
3,0	0,86 (0,08)	0,52 (0,06)	0,91 (0,04)
3,5	0,86 (0,07)	0,57 (0,06)	0,91 (0,04)
4,0	0,86 (0,07)	0,61 (0,06)	0,94 (0,05)
4,5	0,86 (0,07)	0,64 (0,07)	0,97 (0,05)
5,0	0,85 (0,08)	0,71 (0,09)	0,98 (0,05)
10,0	0,81 (0,08)	0,72 (0,11)	1,10 (0,06)
15,0	0,85 (0,08)	0,59 (0,04)	1,05 (0,07)
20,0	0,83 (0,08)	0,51 (0,08)	0,98 (0,07)
25,0	0,79 (0,07)	0,48 (0,06)	0,97 (0,07)
30,0	0,79 (0,08)	0,48 (0,06)	0,97 (0,07)

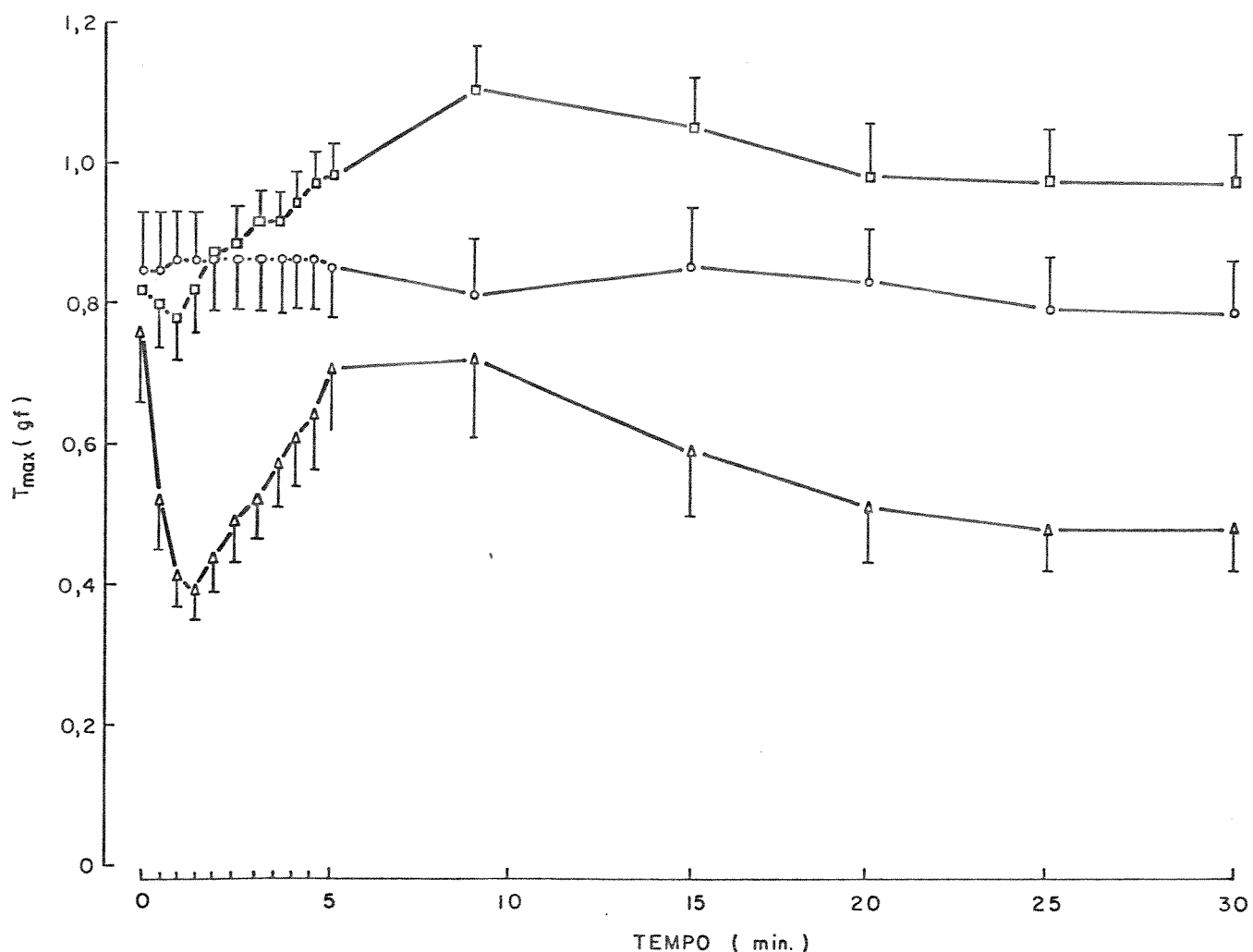


Fig.14. Curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas sobre a tensão máxima desenvolvida (T_{max}) pelo tecido auricular esquerdo isolado de rato, em regime de contração isométrica, sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min. Ordenadas: valor absoluto de T_{max} em grama-força. Abscissas: tempo, em minutos, após aplicação das soluções. Simbologia: (Δ)- solução hiperosmótica de NaCl; ($\square$)- solução hiperosmótica de sacarose; ($\circ$)- solução controle (Krebs-Henseleit).

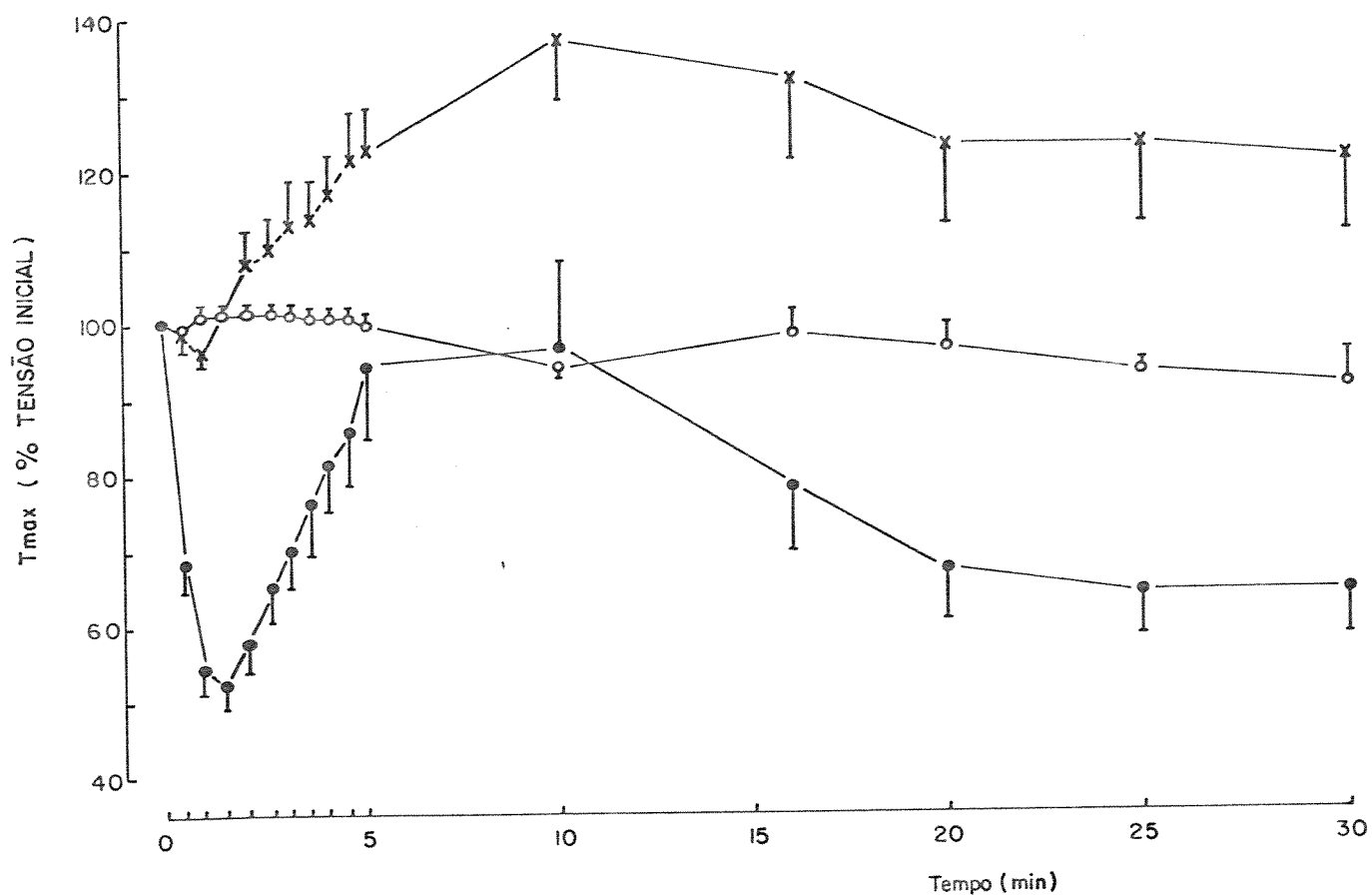


Fig.15- Curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas sobre a tensão máxima desenvolvida (Tmax) pelo tecido auricular esquerdo isolado de rato, em regime de contração isométrica, sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min. Ordenadas: Tmax em porcentagem do seu valor inicial (valor em t=0 min.). Abscissas: tempo em minutos após aplicação das soluções. Simbologia: (x)- solução hiperosmótica de sacarose; (o)- solução de Krebs-Henseleit (controle); (•)- solução hiperosmótica de NaCl.

QUADRO 25- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de NaCl com o efeito produzido pela solução controle (Krebs-Henseleit) sobre o curso temporal de Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido atrial esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTOS (A) (NaCl, controle)	1	54,141	***
TEMPO (B)	14	0,886	NS
A X B	14	4,155	***
(A,B)	29		
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste "t" de Student para comparação entre os contrastes de Tmax (NaCl x controle) em diferentes tempos após aplicação das soluções.

TEMPO (min.)	0	1,5	10	30
	NS	***	NS	**

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

QUADRO 26- a) resultado da análise de variância bifatorial comparando o efeito produzido pela solução hiperosmótica (mOsm/l = 150) de SACAROSE(SAC) com o efeito produzido pela solução CONTROLE (Krebs-Henseleit) sobre o curso temporal de Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
TRATAMENTOS (A) (SAC X CONTROLE)	1	21,883	***
TEMPO (B)	14	0,508	NS
A X B	14	4,060	***
(A,B)	29		
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste "t" de Student para comparação dos contrastes de Tmax (SACAROSE X CONTROLE) em diferentes tempos após a aplicação das soluções.

TEMPO (min.)	0	1,5	10	30
	NS	NS	**	*

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0.001$.

trole. Finalmente Tmax decaiu para um valor de equilíbrio menor que o valor controle ($p < 0,001$).

b) A solução hiperosmótica de sacarose, ao contrário, aumentou Tmax atingindo um valor máximo em 10 minutos, acima do valor controle ($p < 0,01$), decaindo em seguida, para um valor de equilíbrio, ainda superior ao nível controle ($p < 0,05$).

c) Comparando o curso temporal de Tmax após a aplicação da solução hiperosmótica de NaCl com o curso temporal de Tmax do experimento controle (aplicação da solução de Krebs-Henseleit) observou-se que a Tmax total desenvolvida durante o tempo considerado foi menor ($p < 0,001$) na presença do NaCl hiperosmótico e apenas neste caso se observou variações temporais de Tmax que incluíam redução de força contrátil (vide Fig. 15 e Quadro 25).

d) Comparando o curso temporal de Tmax após aplicação da solução hiperosmótica de sacarose, com o curso temporal de Tmax no experimento controle, observou-se que a Tmax total desenvolvida durante o tempo considerado foi maior ($p < 0,001$) na presença da solução hiperosmótica de sacarose.

4.3.2 Bloqueio de receptores

Encontram-se na Tabela XIII, ilustrados na figura 16 médias de Tmax obtidas da aplicação rápida e mantida de soluções hiperosmó-

TABELA XIII- Influência do bloqueio alfa-adrenérgico e colinérgico com fenoxibenzamina (10 μ M) e beta-adrenérgico com propranolol (30 nM) sobre o curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas (mOsm/l = 150) de NaCl e de sacarose sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida). Os valores tabelados correspondem a porcentagens do valor inicial de Tmax, registrados durante 30 minutos a partir da aplicação das soluções hiperosmóticas ou da solução controle em tecido atrial esquerdo isolado de rato sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min. Os números entre parênteses representam os erros padrões das médias (EPM)

SOLUÇÃO	CONTROLE (n=6)	NaCl (n=6)	SACAROSE (n=6)
TEMPO (min.)			
0,5	100,00 (0,00)	56,57 (4,94)	96,73 (1,26)
1,0	100,00 (0,00)	43,12 (3,55)	98,54 (2,01)
1,5	100,00 (0,00)	46,12 (3,10)	101,09 (2,71)
2,0	100,00 (0,00)	53,42 (3,08)	106,33 (3,26)
2,5	100,00 (0,00)	60,20 (2,44)	109,63 (4,71)
3,0	100,00 (0,00)	67,74 (2,42)	113,36 (4,38)
3,5	100,00 (0,00)	74,16 (2,54)	116,51 (5,34)
4,0	100,00 (0,00)	78,55 (3,32)	120,75 (6,06)
4,5	100,00 (0,00)	83,64 (3,24)	124,20 (6,89)
5,0	99,52 (0,48)	89,28 (3,86)	128,30 (6,89)
10,0	99,52 (0,48)	99,46 (4,42)	148,76 (7,64)
15,0	98,87 (0,72)	92,86 (4,17)	151,72 (7,31)
20,0	98,15 (1,25)	85,82 (3,31)	147,89 (6,40)
25,0	98,15 (1,25)	79,31 (3,68)	144,71 (6,16)
30,0	97,03 (1,91)	78,87 (3,68)	144,71 (6,16)
Tmax inicial(gf)	0,71 (0,08)	0,70 (0,04)	0,69 (0,05)

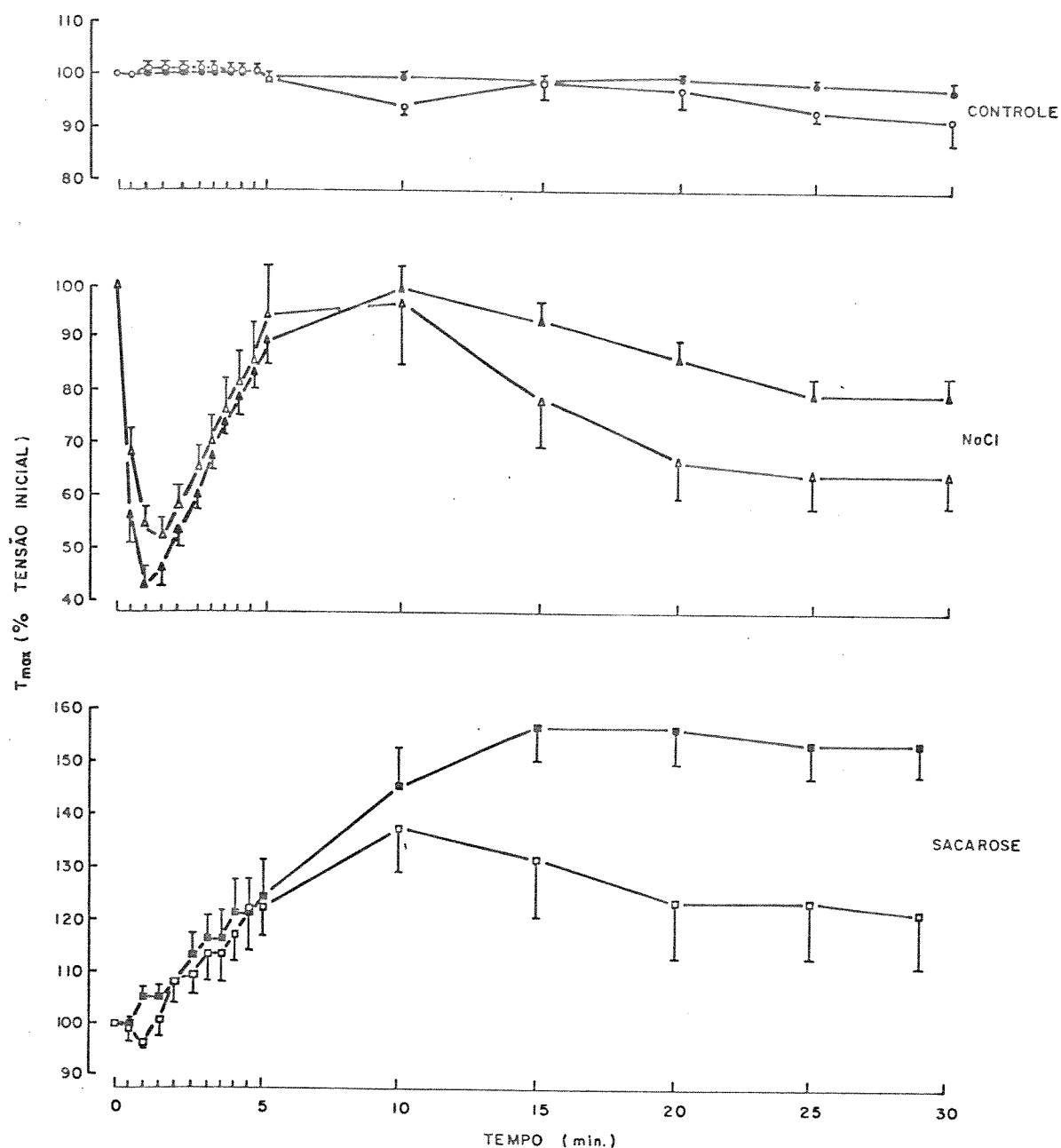


Fig.16- Influência do bloqueio de receptores alfa-adrenérgicos e colinérgicos com fenoxibenzamina ($10 \mu\text{M}$) e beta-adrenérgicos com propranolol (30 nM), no curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas ($\Delta\text{mOsm} = 150$) de NaCl e sacarose sobre T_{max} (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, contraindo isometricamente sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min. Ordenadas: T_{max} , % tensão inicial. Abscissas: tempo (minutos) após a aplicação das soluções hiperosmóticas. Simbologia: os símbolos preenchidos se referem aos experimentos efetuados na presença dos bloqueadores. O tipo de solução utilizada está indicado à direita de cada par de curvas. As barras verticais representam os erros padrões das médias.

ticas de NaCl e de sacarose na presença de bloqueio de receptores adrenérgicos e colinérgicos com fenoxibenzamina (10 μ M) e propranolol (30 nM). Nos Quadros 27, 28 e 29 estão ilustrados os resultados das análises de variância bifatoriais efetuadas para comparação dos valores de Tmax na presença e na ausência de bloqueio de receptores. As comparações foram feitas na solução controle (Krebs-Henseleit) e nas soluções hiperosmóticas (NaCl e sacarose, $\Delta mOsm/l=150$). Nestes mesmos quadros estão ilustrados ainda os resultados dos testes "t" de Student efetuados para comparação dos contrastes.

Das análises efetuadas, os principais resultados foram os seguintes:

- a) O bloqueio dos receptores alfa e beta adrenérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos, não afetou o curso temporal, nem os valores absolutos de Tmax, na solução controle;
- b) o curso temporal do efeito da solução hiperosmótica ($\Delta mOsm/l = 150$) de NaCl foi afetado pelo bloqueio dos receptores (vide Quadro 28a). Contudo, no conjunto dos instantes de tempo considerados, Tmax não diferiu entre os dois tratamentos (bloqueado x não-bloqueado);
- c) a análise de contrastes revelou que a queda produzida em Tmax, pela solução hiperosmótica de NaCl não foi diferente na presença ou na ausência de bloqueio (vide Fig.15; Quadro 28b);
- d) o curso temporal do efeito da solução hiperosmótica de sacarose

QUADRO 27- Resultado da análise de variância bifatorial comparando o curso temporal de Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido atrial esquerdo isolado de rato, em solução de Krebs-Henseleit (controle), estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min. na presença ou não de bloqueio de receptores alfa-adrenérgicos e colinérgicos com fenoxibenzamina (10 μ M) e beta-adrenérgicos com propranolol (30 nM).

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
BLOQUEIO (A)	1	2,278	NS
TEMPO (B)	14	4,246	***
A X B	14	1,567	NS
(A,B)	29		
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

NS- não significativo; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 28- a) Resultado da análise de variância bifatorial comparando o curso temporal do efeito de solução hiperosmótica de NaCl ($\Delta mOsm/l = 150$) sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), na ausência ou não de bloqueio alfa-adrenérgico e colinérgico com fenoxibenzamina (10 μM) e beta-adrenérgico com propranolol (30 nM), em tecido atrial esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
BLOQUEIO (A)	1	0,117	NS
TEMPO (B)	14	8,286	***
A X B	14	1,802	*
(A,B)	29		
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste "t" de Student para comparação de contrastes (NaCl-com bloqueio x NaCl-sem bloqueio) em diferentes tempos após aplicação da solução hiperosmótica de NaCl.

TEMPO APÓS APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO HIPEROSMÓTICA DE NaCl(min.)	0	1,5	10	30
	NS	NS	NS	NS

NS- não significativo; *- $p < 0,05$; ***- $p < 0,001$.

QUADRO 29- a) Resultado da análise de variância bifatorial comparando o curso temporal do efeito de solução hiperosmótica de SACAROSE ($\Delta\text{mOsm/l} = 150$) sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), na ausência ou não de bloqueio alfa-adrenérgico e colinérgico com fenoxibenzamina ($10 \mu\text{M}$) e beta-adrenérgico com propranolol (30 nM), em tecido atrial esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F	
BLOQUEIO (A)	1	11,318	***
TEMPO (B)	14	12,295	***
A X B	14	1,240	NS
(A,B)	29		
RESÍDUO	150		
TOTAL	179		

b) teste "t" de Student para comparação de contrastes (sacarose-com bloqueio x sacarose-sem bloqueio) em diferentes tempos após aplicação da solução hiperosmótica de SACAROSE.

TEMPO APÓS APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO HIPEROSMÓTICA DE SACAROSE (min.)	0	10	30
	NS	NS	NS

NS- não significativo; ***- $p < 0,001$.

não foi afetado pelo bloqueio dos receptores. Embora a análise de contrastes tenha revelado diferenças significativas entre preparações bloqueadas e não bloqueadas, no conjunto de todas as frequências o bloqueio de receptores aumentou o valor de T_{max} (vide quadro 29; fig.15).

4.3.3 Efeito do aumento de osmolalidade com cloreto de colina e do aumento da concentração de cloreto de cálcio na solução hiperosmótica de NaCl.

Encontram-se na Tabela XIV, ilustrados nas figuras 17 e 18 médias de T_{max} (tensão máxima desenvolvida), obtidas da aplicação rápida e mantida das soluções hiperosmóticas de cloreto de colina e de NaCl com alta concentração de cloreto de cálcio (vide item 3.3 c e d pag.20 , deste trabalho).

No Quadro 30 estão ilustrados os resultados dos testes "t" de Student realizados para comparação de contrastes (Quadro 30 b e c) e da análise de variância monofatorial investigando o efeito, sobre T_{max} , da solução hiperosmótica de NaCl com alta concentração de cloreto de cálcio (Quadro 30 a).

Das análises efetuadas os seguintes resultados foram obtidos:

a) A solução hiperosmótica de cloreto de colina, ao contrário do que

TABELA XIV- Curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas (mOsm/l = 150) de cloreto de colina e de NaCl-com cálcio aumentado (7,22mM) sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido atrial esquerdo isolado de rato e estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min. Os valores tabelados são as médias de Tmax (% do controle) registrados durante 30 minutos após a aplicação das soluções hiperosmóticas. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUÇÃO	CLORETO DE COLINA (n=6)	NaCl COM CaCl ₂ AUMENTADO (n=6)
TEMPO (min.)		
0,0	100,0 (0,0)	100,0 (0,0)
0,5	94,9 (6,1)	76,7 (3,4)
1,0	107,6 (10,7)	79,4 (2,4)
1,5	115,7 (16,3)	87,7 (1,7)
2,0	121,9 (19,2)	94,9 (3,2)
2,5	126,8 (22,9)	101,4 (4,5)
3,0	127,6 (22,7)	106,9 (6,0)
3,5	134,6 (24,7)	112,1 (7,8)
4,0	136,1 (23,5)	116,3 (9,1)
4,5	142,3 (26,7)	119,0 (9,5)
5,0	145,2 (24,3)	121,9 (10,6)
10,0	147,0 (24,5)	118,2 (13,0)
15,0	133,8 (14,0)	106,7 (9,8)
20,0	127,1 (13,7)	105,6 (8,7)
25,0	126,8 (11,7)	103,0 (7,3)
30,0	126,8 (11,7)	100,7 (7,3)

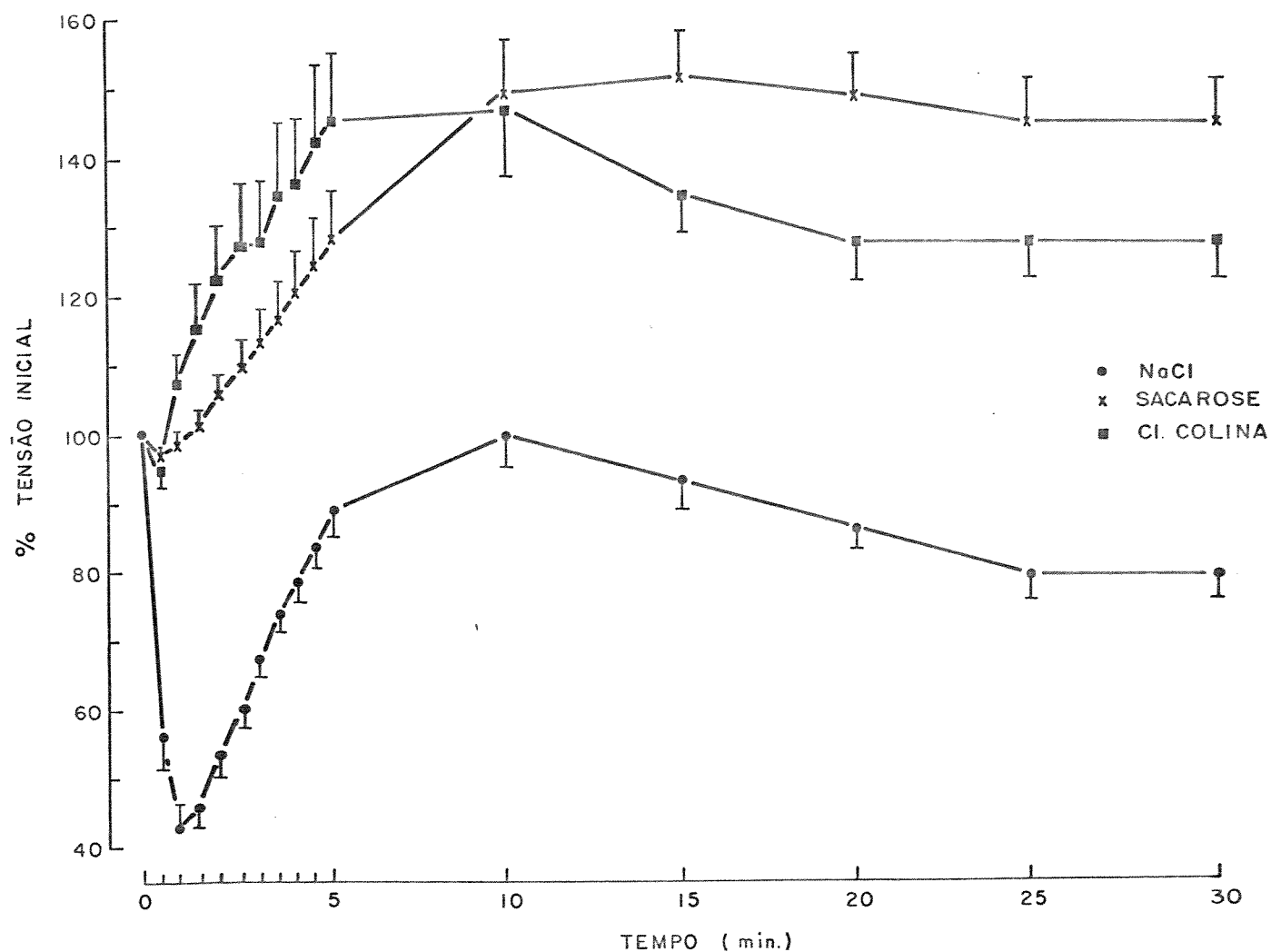


Fig.17- Influência da substituição do íon sódio por colina, no efeito da solução hiperosmótica ($\Delta\text{mOsm/l} = 150$) de NaCl sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min. O efeito da solução hiperosmótica de sacarose foi incluído para comparação. Ordenadas: Tmax (% valor inicial). Abscissas: Tempo (minutos) após a aplicação da solução. Simbologia: (•)- solução hiperosmótica de NaCl; (■)- solução hiperosmótica com cloreto de colina; (x)- solução hiperosmótica de sacarose

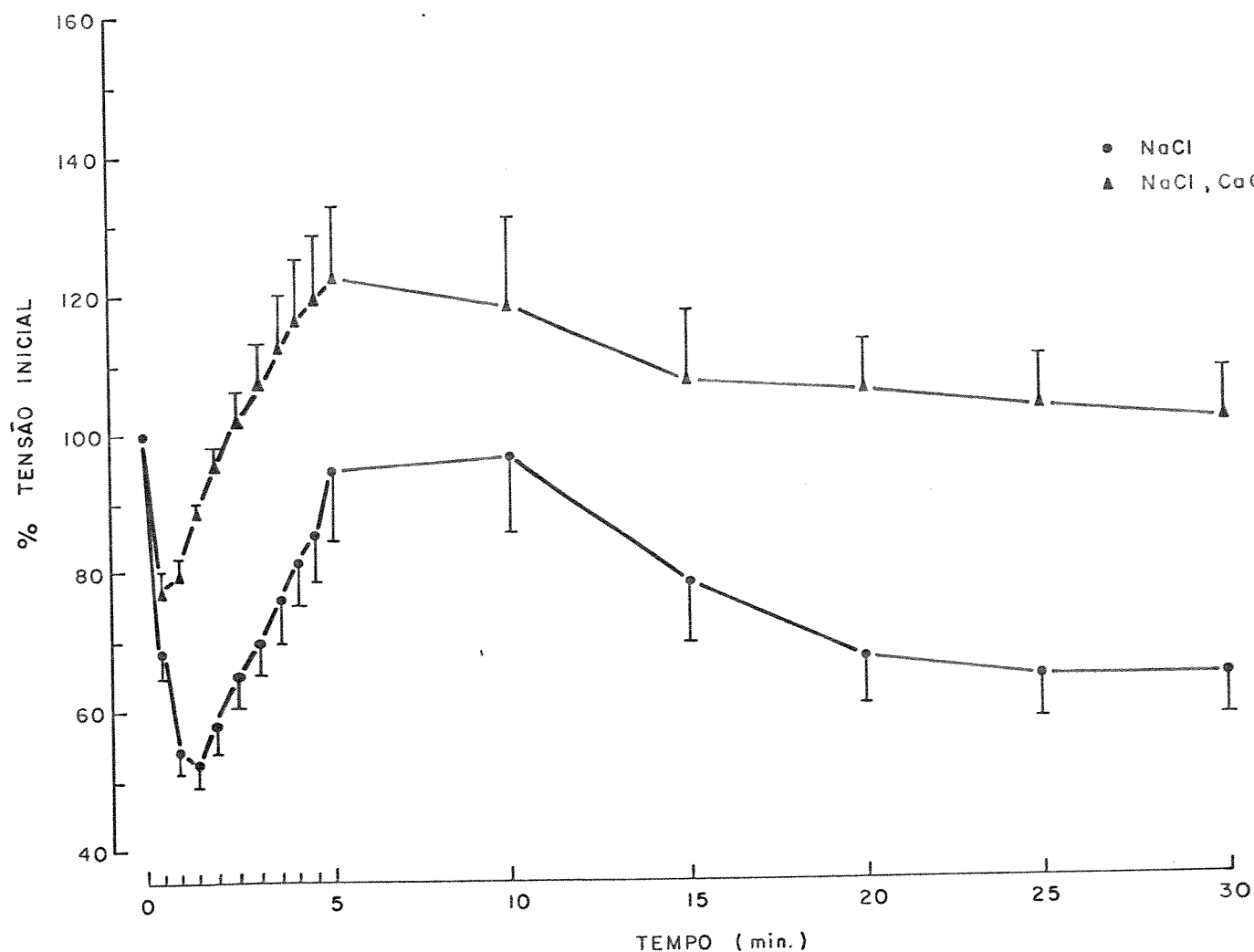


Fig.18- Curso temporal do efeito da solução hiperosmótica de NaCl ($\Delta mOsm/l = 150$) com concentração de cloreto de cálcio aumentada, sobre a tensão máxima desenvolvida (T_{max}), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min. O efeito da solução hiperosmótica de NaCl foi incluído no gráfico, para comparação. Ordenadas: T_{max} (% tensão inicial). Abscissas: tempo (minutos) após a aplicação da solução. Simbologia: (•) - solução hiperosmótica de NaCl com cloreto de cálcio normal (2,21 mM); (▲) - solução hiperosmótica de NaCl com cloreto de cálcio aumentado (7,22 mM).

QUADRO 30- a) resultado da análise de variância monofatorial realizada para verificar a existência de variação temporal do efeito da solução hiperosmótica de NaCl com concentração de cloreto de cálcio aumentada ($\Delta mOsm/l = 150$) sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, sob estimulação elétrica na frequência de 64 est./min.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	F
ENTRE	15	0,0167 NS
DENTRO	80	
TOTAL	95	

b) resultado do teste "t" de Student realizado para comparação de contrastes entre os efeitos produzidos pela solução hiperosmótica de NaCl com alta concentração de cloreto de cálcio e pela solução de Krebs-Henseleit (controle) sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida), em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

TEMPO APÓS APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO (min.)	0,5	5	15	30
	**	NS	NS	NS

c) resultado do teste "t" de Student realizado para comparação de contrastes entre pontos do curso temporal dos efeitos produzidos pela solução hiperosmótica de cloreto de colina e solução controle sobre Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido auricular esquerdo isolado de rato, estimulado eletricamente na frequência de 64 est./min.

TEMPO APÓS APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO (min.)	5	30
	**	**

TABELA XV- Curvas de recuperação e de aumento de Tmax (tensão máxima desenvolvida) obtidas respectivamente dos cursos temporais dos efeitos de soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose (valores obtidos da Tabela XII), no intervalo de 1,5 a 5 minutos após a aplicação das soluções, em tecido atrial esquerdo isolado de rato, estimulado nas frequências de 16 e 64 est./min. Estão tabeladas as médias dos valores individuais de Tmax expressos como porcentagem do maior valor atingido após a aplicação das soluções hiperosmóticas. Os números entre parênteses são os erros padrões das médias (EPM).

SOLUTOS

TEMPO (min)	NaCl (n=6)		SACAROSE (n=6)	
	FREQUÊNCIAS		FREQUÊNCIAS	
	16	64	16	64
1,5	-	51,57 (4,81)	75,44 (1,60)	73,81 (3,62)
2,0	-	60,22 (3,07)	77,93 (1,32)	78,99 (3,63)
2,5	61,31 (9,70)	67,07 (4,72)	79,83 (0,99)	80,14 (3,48)
3,0	64,61 (5,24)	71,80 (4,82)	81,34 (0,90)	82,56 (3,26)
3,5	67,66 (4,82)	76,80 (3,30)	82,85 (0,69)	82,56 (3,26)
4,0	70,08 (4,25)	82,61 (3,58)	83,98 (1,05)	85,42 (2,80)
4,5	72,93 (4,23)	86,33 (3,06)	85,36 (0,85)	88,46 (2,53)
5,0	75,05 (4,08)	93,66 (2,78)	86,64 (0,87)	89,22 (2,78)

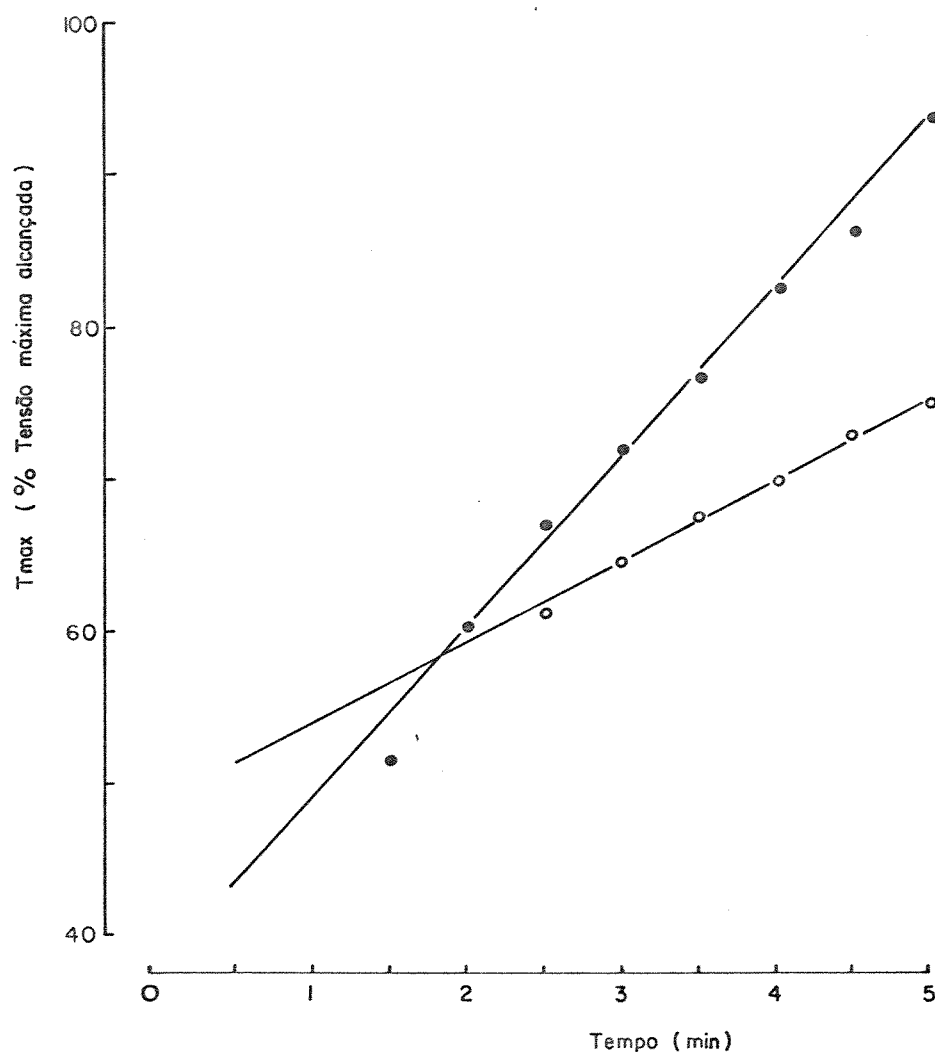


Fig.19- Curvas de recuperação de T_{max} (tensão máxima desenvolvida) pelo tecido cardíaco isolado de rato em resposta à exposição a soluções hiperosmóticas de NaCl ($\Delta mOsm/l = 150$) em duas frequências estimulatórias. Os pontos locados no gráfico foram obtidos a partir da Tabela XV. Ordenadas: T_{max} expresso como porcentagem do maior valor atingido a partir da aplicação da solução hiperosmótica. Abscissas: tempo em minutos. A linha contínua corresponde à reta calculada pelo método dos mínimos quadrados, em cada frequência: (●)- 64 est./min.; $y = 11,34x + 37,47$ e (○)- 16 est./min.; $y = 5,35x + 41,59$.

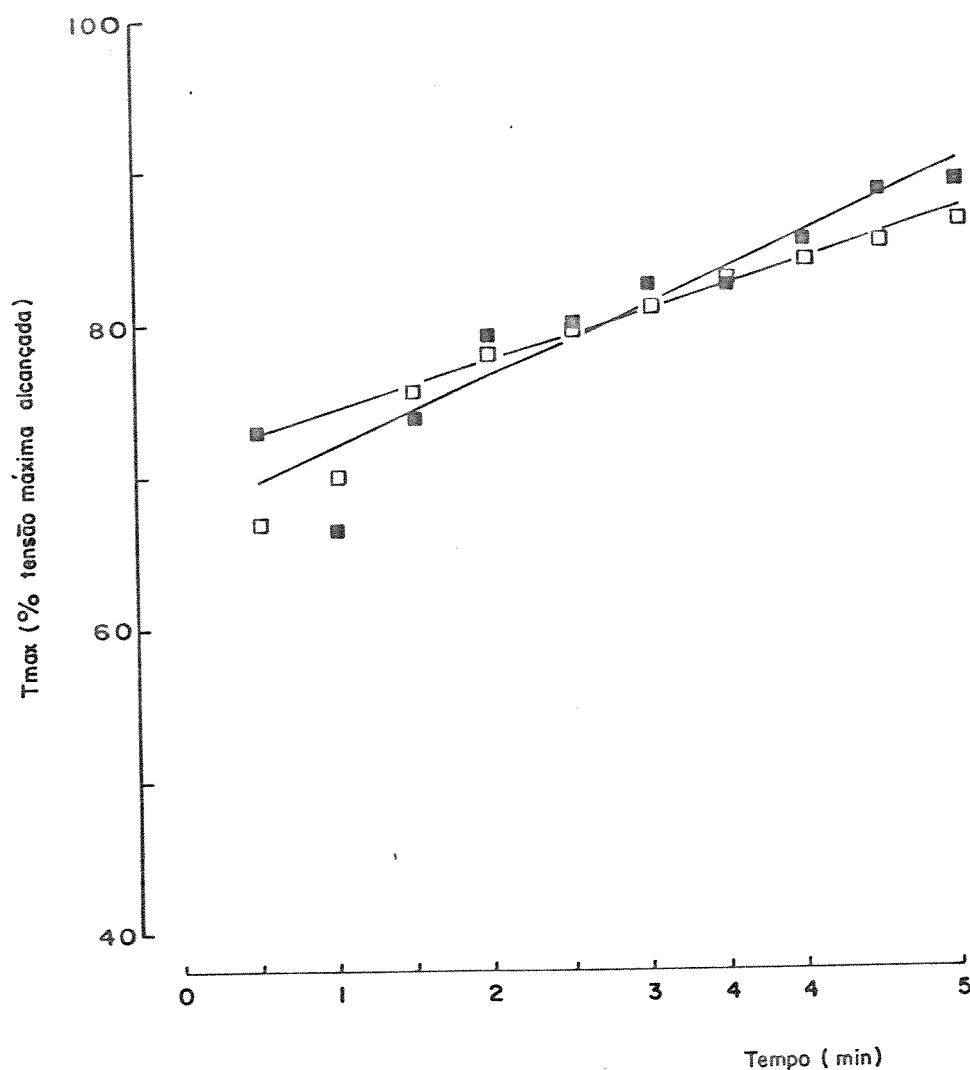


Fig.20- Curvas de aumento de Tmx (tensão máxima desenvolvida) pelo tecido cardíaco isolado de rato em resposta à exposição a soluções hiperosmóticas de sacarose (mOsm/l = 150) em duas frequências estimulatórias. Os pontos locados no gráfico estão apresentados na Tabela XV. Ordenadas: Tmx expressa como porcentagem do maior valor de Tmx a partir da aplicação da solução hiperosmótica. Abscissas: tempo em minutos. A linha contínua corresponde à reta calculada pelo método dos mínimos quadrados, em cada frequência: (■)- 64 est./min.; $y = 4,86x + 67,11$ e (□)- 16 est./min.; $y = 3,22x + 71,12$.

QUADRO 31- Resultado da comparação dos coeficientes angulares das retas calculadas (vide figs. 19 e 20) a partir dos pontos da Tabela XV. A comparação foi estabelecida por superposição dos intervalos de confiança para 95 % .

SOLUÇÃO HIPEROSMÓTICA	FREQUENCIA (est./min.)	COEFICIENTE ANGULAR	r	INTERVALO DE CONFIANÇA
NaCl	16	5,36	1,0	(3,94 - 6,77)
	64	11,34	0,99	(9,25 - 13,42)
SACAROSE	16	3,22	0,96	(2,72 - 3,73)
	64	4,68	0,94	(3,31 - 6,05)

r- coeficiente de correlação

eficientes angulares das retas calculadas pelo método dos mínimos quadrados, sobre os pontos da Tabela XII

Os resultados obtidos das comparações efetuadas foram os seguintes:

a) Os valores de T_{max} contidos no intervalo de 1,5 a 5 minutos após a aplicação da solução hiperosmótica de NaCl, correspondentes a fase de recuperação de T_{max} após sua queda inicial, se ajustaram adequadamente a reta $y = bx + a$, onde "y" corresponde ao valor de T_{max}, tomado como porcentagem da máxima tensão desenvolvida, "x" é o tempo em minutos após aplicação das soluções hiperosmóticas e "a" e "b" são respectivamente o intercepto e o coeficiente angular da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados (vide quadro 31). Este fato é também verdadeiro para os valores de T_{max} quando o tecido em estudo é submetido a ação da solução hiperosmótica de sacarose. Em ambos os casos, NaCl e Sacarose, obteve-se um ajuste adequado à reta nas duas frequências utilizadas, 16 e 64 est./min.;

b) a taxa de recuperação de T_{max} na solução hiperosmótica de NaCl foi maior para a maior frequência (vide Fig.19);

c) a taxa de aumento de T_{max} na solução hiperosmótica de Sacarose não variou significativamente com a frequência estimulatória (vide Fig.20, Quadro 31).

4.3.5 Variação da concentração extracelular de NaCl sem modificação de osmolalidade.

A Figura 21 reúne ilustrações dos efeitos produzidos sobre T_{max} pelas soluções hiperosmóticas ($\Delta mOsm/l = 150$) de NaCl e de Cloreto de colina, confrontadas à ilustração do resultado obtido do aumento da concentração de cloreto de sódio sem variação de osmolalidade do fluido nutriente, nas osmolalidades de 300 e de 450 $mOsm/l$. A análise destes gráficos indicou que:

- a) O aumento da concentração extracelular de cloreto de sódio (98 mM), reduz T_{max} para um valor de 10 a 20% de seu valor inicial;
- b) a queda de T_{max} produzida pelo aumento da concentração de NaCl sem concomitante aumento de osmolalidade, não é seguida da fase de recuperação, permanecendo estável até o final do experimento, independente da osmolalidade da solução nutriente.

4.4 Estequiometria da troca Na^+/Ca^{++} no tecido cardíaco isolado de rato em meio iso e hiperosmótico.

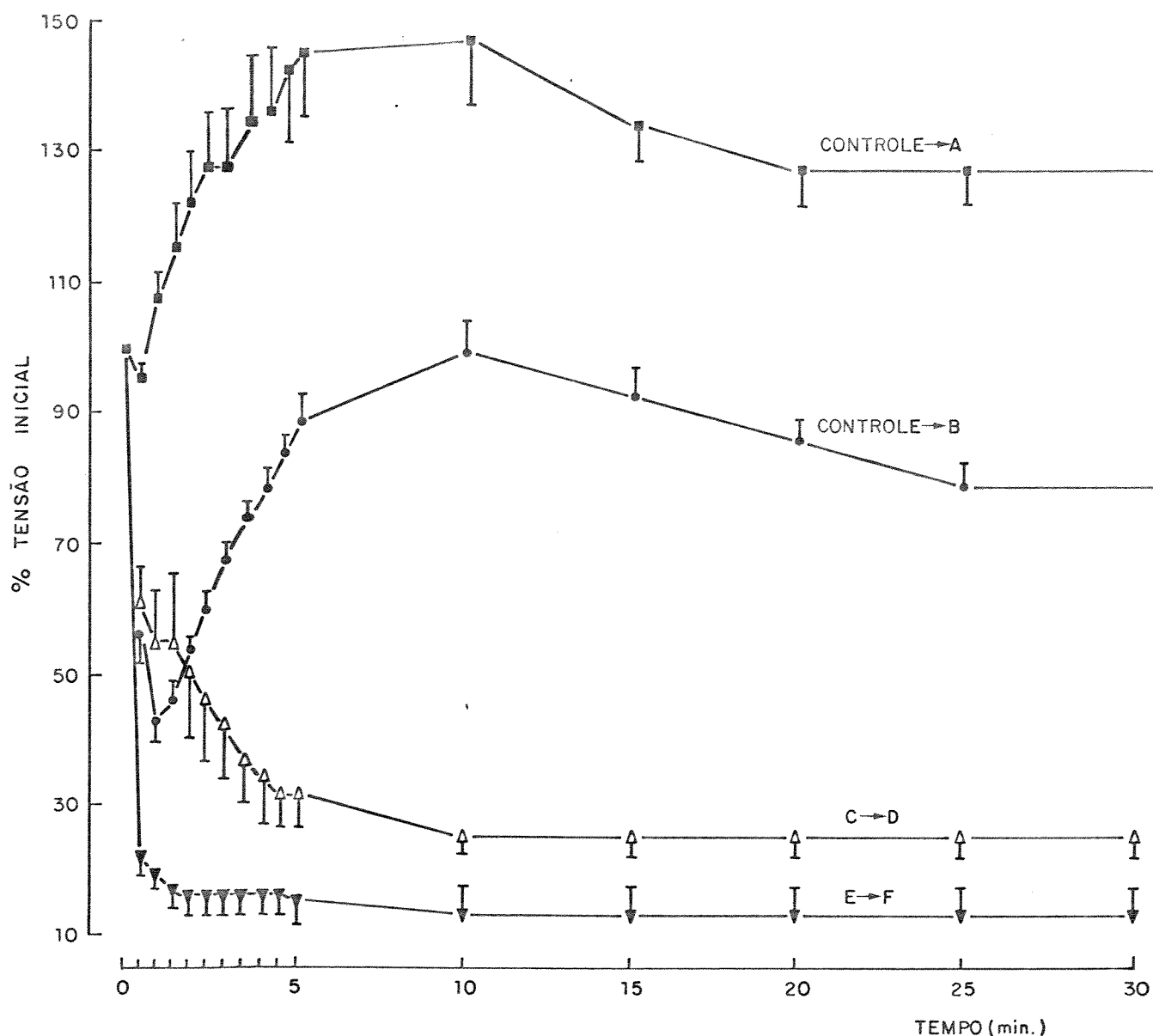


Fig.21- Cursos temporais de Tmax (tensão máxima desenvolvida) em tecido cardíaco isolado de rato sob influência da troca do líquido de incubação. A- solução hiperosmótica de cloreto de colina (450 mOsm/l); B- solução hiperosmótica de NaCl (450 mOsm/l); C- solução com baixa concentração de NaCl (42,2 mM) e de CaCl₂ (0,23 mM) e com osmolalidade de 300 mOsm/l; D- solução com baixa concentração de CaCl₂ (0,28 mM); E- solução idem à do item C, com osmolalidade de 450 mOsm/l; F- solução com baixa concentração de CaCl₂ (0,35) e osmolalidade de 450 mOsm/l. Todas as variações de concentração e/ou osmolalidade são relativas à solução de Krebs-Henseleit (controle). As transições entre os líquidos de incubação estão indicadas na parte superior de cada gráfico. A seta (→) indica a mudança de uma para outra solução, efetuada no instante inicial (tempo = 0 min.).

A tabela XVI ilustra os valores de n calculados a partir do procedimento descrito no item 3.(e) deste trabalho. No quadro 32 estão apresentados os intervalos de confiança para os valores médios de n em condições iso e hiperosmóticas. Os resultados obtidos foram os seguintes:

a) Em condições isosmóticas o valor de n calculado a partir da medição da tensão máxima desenvolvida pelo músculo cardíaco, supondo-se V_m (potencial de membrana) nulo, foi compatível, na preparação estudada, com uma estequiometria de transporte na qual são transportados dois íons sódio, para cada íon cálcio;

b) Em condições hiperosmóticas o valor de n mostrou-se reduzido ($n = 1,65$), sendo significativamente menor que o valor de n igual a 2 (dois) obtido em condições isosmóticas.

TABELA XVI - Valores de n (estequiometria do transporte pelo mecanismo de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$), obtidos em condições iso e hiperosmóticas no tecido cardíaco isolado de rato. $[\text{Ca}^{++}]_o$ e $[\text{Na}^+]_o$ correspondem respectivamente às concentrações dos íons cálcio e sódio na solução de Krebs - Henseleit (controle). $[\text{Ca}^{++}]_{o^*}$ e $[\text{Na}^+]_{o^*}$ são respectivamente as concentrações de cálcio e sódio na nova solução. (N = número de experimentos)

$[\text{Ca}^{++}]_o$	$[\text{Na}^+]_o$	$[\text{Ca}^{++}]_{o^*}$	$[\text{Na}^+]_{o^*}$	n	
2,5	140	0,23	42,2	2,00	ISO (N=4)
2,5	140	0,23	42,2	2,00	
2,5	140	0,30	42,2	1,66	
2,5	140	0,24	42,2	1,95	
2,5	140	0,36	42,2	1,62	HIPER (N=3)
2,5	140	0,38	42,2	1,58	
2,5	140	0,31	42,2	1,75	

QUADRO 32 - Intervalos de confiança para n obtidos para verificar se este inclui o valor 2, em condições iso e hiperosmóticas, no tecido cardíaco isolado de rato. Os cálculos foram feitos com base nos dados da tabela XVI.

n (médio)	Intervalo de confiança	
1,90	$1,66 < n < 2,14$	ISO
1,65	$1,40 < n < 1,91$	HIPER

- intervalos de confiança calculados para 1% de significância.

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise trifatorial do efeito de soluções hiperosmóticas sobre o tecido cardíaco isolado de rato.

Os resultados apresentados no item 4.1 do presente trabalho foram obtidos a partir do estudo do efeito de soluções hiperosmóticas sobre a força contrátil do tecido cardíaco isolado de rato. Neste estudo analisou-se conjuntamente a influência de três variáveis, o soluto (NaCl e sacarose), a osmolalidade (doses) e a frequência estimulatória na determinação dos valores dos diversos parâmetros (T_{max} , dT/dt_{max} , tT_{max} , tD e dT/dt_{min}) das contrações individuais.

Os efeitos produzidos pelos dois solutos não foram iguais, na mesma preparação biológica. De modo geral, o NaCl teve tendência a reduzir, e a sacarose a aumentar a força desenvolvida pelo músculo cardíaco (vide fig.05; quadro 01). Estes resultados encontram concórdância em inúmeros trabalhos da literatura que demonstram redução de força contrátil causada pelo aumento da concentração extracelular de NaCl (McDowall et alii, 1955; Philipson et alii, 1980; Mullins,

1981; Blaunstein & Nelson, 1982; Lee et alii, 1985) e aumento da força contrátil por efeito de soluções hiperosmóticas de solutos não iônicos em tecido cardíaco de mamíferos (Koch-Weser, 1963; Wildenthal et alii, 1969; Crie et alii, 1976; Willerson et alii, 1978).

Além disso, a análise efetuada revelou o fato ainda não descrito na literatura, de que, para ambos os solutos, em apenas uma das frequências utilizadas foi detectada relação de dose-dependência estatisticamente significativa (vide fig.01, quadro 02). Na frequência de 64 est./min. o NaCl reduziu a tensão máxima desenvolvida (T_{max}) sem alteração significativa do tempo total de duração das contrações (t_D) e do tempo para ocorrência da máxima tensão (t_{Tmax}), com consequente redução das derivadas temporais máxima (dT/dt_{max}) e mínima (dT/dt_{min}) de desenvolvimento de tensão. Estes resultados caracterizaram, nesta frequência, efeito inotrópico negativo dose-dependente das soluções hiperosmóticas de NaCl sobre o tecido cardíaco isolado de rato. Ao contrário, as soluções hiperosmóticas de sacarose aumentaram de modo dose-dependente T_{max} e dT/dt_{max} com aumento simultâneo de t_D , produzindo efeito inotrópico positivo, porém em outra frequência estimulatória (16 est./min.).

O tempo total de duração das contrações (t_D), apresentou um comportamento não trivial. Na frequência em que T_{max} sofreu redução com o aumento da dose, t_D não se alterou, mas na frequência de 4 e 16 est./min., nas quais T_{max} não apresentou variação significativa, t_D aumentou de modo dose-dependente. Este fato permitiu a identificação inédita, in "vitro", de um efeito inotrópico positivo para o NaCl

(vide figs. 05 e 07; quadro 06). Um aumento de tD , de modo dose-dependente, também foi observado na presença das soluções hiperosmóticas de sacarose, porém, de modo independente da frequência estimulatória, o que sugere que estes aumentos de tD para ambos os solutos tenham se efetuado por diferentes mecanismos.

O fato de que a frequência estimulatória modifica o efeito de agentes cardioativos já é conhecido (Koch-Weser & Blinks, 1962; Koch-Weser & Blinks, 1963; Endoh & Schumann, 1975; Siegl & McNeil, 1982). Neste trabalho, além da comprovação deste fato também para as soluções hiperosmóticas, verificou-se que o efeito das doses sobre T_{max} dependeu da frequência de modo diferente para cada soluto e que a relação de dose-dependência existente em uma frequência pode não existir em outra (vide fi.05 e quadros 01 e 02).

O tempo para a tensão atingir o seu máximo valor (tT_{max}) foi o parâmetro menos sujeito à influência das variáveis estudadas, não tendo sido afetado nem pelo soluto nem pela frequência, com uma única exceção: na presença das soluções hiperosmóticas de sacarose houve aumento significativo de tT_{max} na dose de 150 mOsm/l e frequência de 64 est./min. A invariabilidade de tT_{max} com a frequência, observada no presente trabalho, encontra apoio em trabalhos anteriores, nos quais o mesmo resultado foi descrito em tecido cardíaco de gato (Koch-Weser, 1963) e de rato (Bassani et alii, 1986).

A análise das derivadas revelou que, de modo geral, houve tendência de aumento de "velocidade" de contração e de relaxamento do

tecido cardíaco, na presença das soluções hiperosmóticas de sacarose, enquanto que, na presença das soluções hiperosmóticas de NaCl, o efeito foi oposto, ou seja, tanto a contração quanto o relaxamento se apresentaram mais lentos (vide figs. 08 e 09).

Finalmente, os resultados obtidos da análise trifatorial realizada no presente trabalho (vide item 4.1) sugerem que as divergências entre resultados de experimentos "in vivo", descritas na literatura (vide Konzeny et alii, 1985), possam, ^{pelo menos} em parte, estar sendo causadas por múltiplas interações das variáveis dose, frequência e soluto.

5.2 Relação Força-Frequência em tecido atrial esquerdo de rato na presença de soluções hiperosmóticas.

A força desenvolvida pelo tecido cardíaco "in vitro" é fortemente influenciada pela frequência ou ritmo ao qual o tecido esteja sendo submetido (Benforado, 1958; Hoffman & Kelly, 1959; Blinks & Koch-Weser, 1961; Meijler, 1962; Meijler et alii, 1962; Koch-Weser, 1963; Koch-Weser & Blinks, 1963; Kedem et alii, 1969; Manring & Hollander, 1971; Anderson et alii, 1973; Forester & Maniwood, 1974; Anderson et alii, 1976; Pidgeon et alii, 1980). A demonstração prévia, neste trabalho (vide item 4.1), de que a frequência modifica o efeito inotrópico das soluções hiperosmóticas sobre o tecido cardíaco isolado de rato, e a aparente inexistência de dados sobre este assun-

to na literatura, motivaram o estudo detalhado da relação entre a força desenvolvida pelo tecido cardíaco e a frequência estimulatória na presença das soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose (vide item 4.2 deste trabalho).

A tensão desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado de rato varia drasticamente com a frequência estimulatória (Blinks & Koch-Weser, 1963; Lakatta et alii, 1985; Bassani et alii, 1986). Diferentemente do que ocorre em outras espécies animais, no rato a relação Tmax-frequência é monotônica decrescente, ou seja, Tmax diminui à medida que a frequência aumenta (Benforado, 1958; Hoffman & Kelly, 1959; Forester & Mainwood, 1974; Allen & Kurihara, 1980). Este inotropismo negativo causado pelo aumento da frequência é ainda um assunto não resolvido. Por um lado há quem proponha que a queda de Tmax seja causada por escassez de algum componente energético que não pode ser repostado entre duas contrações, nas frequências mais altas (Henry, 1975), ou mesmo por insuficiência do próprio suprimento de oxigênio na preparação isolada (Blinks & Koch-Weser, 1963). Por outro lado, tem sido apoiada a hipótese de que a relação Tmax-frequência seja dependente da concentração extracelular de íons cálcio. Forester & Mainwood (1974) relataram que a redução da concentração extracelular de íons cálcio, de 2,5 para 0,3 mM faz com que surja uma fase ascendente na relação Tmax-frequência em miocárdio isolado de rato.

Mais recentemente, Orchard & Lakatta (1985), utilizando a técnica de estimação da concentração intracelular de cálcio por meio da fluorescência da aquorina, mostraram que o aumento da concentração

extracelular de cálcio para níveis bem acima do fisiológico elimina a queda da tensão desenvolvida pelo músculo papilar de rato, causada pelo aumento de frequência. Estes autores, embora demonstrando a importância da influência da concentração extracelular de cálcio de maneira inversa daquela apontada por Forester & Mainwood (1974) defendem a idéia de que a relação T_{max}-frequência dependa, em última análise, da concentração intracelular de íons cálcio, e não diretamente de outros fatores como do suprimento metabólico e/ou de oxigênio.

O bloqueio dos receptores alfa e beta adrenérgicos e dos receptores colinérgicos muscarínicos, na presença da solução controle, realizado neste trabalho, possibilitou a determinação da relação força-frequência sem interferência dos neurotransmissores (noradrenalina e acetilcolina) presentes na preparação. Era de se esperar que, no tecido atrial, a estimulação produzisse liberação destes neurotransmissores e que o efeito resultante fosse um inotropismo negativo considerando-se a grande densidade da inervação colinérgica do tecido auricular (Koch-Weser & Blinks, 1963). No entanto, observou-se que, nas condições estabelecidas (estimulação elétrica com tensão apenas 20% acima da tensão limiar), a liberação de neurotransmissores não alterou significativamente a força de contração. Não se observou nenhuma alteração na forma das curvas "parâmetro"-frequência (vide quadro 15). Além disso, não foram afetados T_{max} e tD. Curiosamente, no entanto, observou-se aumento de tT_{max} nas preparações pré-tratadas com fenoxibenzamina e propranolol. É provável que este aumento tenha sido causado pela eliminação de possíveis efeitos da noradrenalina e/ou da acetilcolina, liberadas do tecido pela estimulação elétrica, agentes

estes que atuam reduzindo tT_{max} (Koch-Weser & Blinks, 1963). Neste caso um efeito inotrópico negativo pôde ser detetado por uma queda de dT/dt_{max} (vide fig.13).

Os efeitos produzidos pelas soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose sobre a relação força-frequência foram diferentes. Levando-se em conta o comportamento dos parâmetros T_{max} e tD , houve tendência de efeito inotrópico positivo do NaCl nas frequências de 8 a 32 est./min. (vide figs. 10 e 12) e efeito inotrópico negativo para frequências acima de 32 est./min. Por outro lado, a solução hiperosmótica de sacarose produziu apenas efeito inotrópico positivo. Este ^{efeito,} caracterizado pelo aumento de T_{max} e dT/dt_{max} com relação às curvas obtidas na presença da solução controle, foi crescente até a frequência de 32 est./min., a partir da qual começou a decair. Contudo, a elevação geral de tD sem nenhuma redução de T_{max} e de dT/dt_{max} abaixo do nível controle caracterizou um efeito inotrópico positivo para a solução hiperosmótica de sacarose no conjunto geral de frequências. É interessante notar que a frequência na qual o tecido cardíaco de rato apresentou maior resposta (avaliada pela medição de T_{max}) às soluções hiperosmóticas (vide fig. 10,B) foi ^{relativamente} alta, acima de 32 est./min., não coincidindo com o ponto de máxima resposta às catecolaminas (freq. de 6 est./min.), já descrito por outros autores (Henderson et alii, 1969).

Encontrar a frequência ótima para ação inotrópica de substâncias cardioativas já foi preocupação de vários autores (Koch-Weser & Blinks, 1962; Endoh & Schümann, 1975; Seigl & McNeil, 1981). Apa-

rentemente os efeitos das diversas substâncias são detectados preferencialmente em determinadas frequências (Endoh & Schümann, 1975). A metoxamina, por exemplo, possui efeito inotrópico positivo que se pronuncia apenas em frequências baixas, mas em altas frequências apresenta efeito depressor da contratilidade (Endoh & Schümann, 1975). O estudo da resposta inotrópica de vários agonistas em várias frequências estimulatórias tem possibilitado a distinção entre os mecanismos utilizados para controle da força de contração cardíaca em diferentes espécies animais (Endoh & Schümann, 1975; Siegl & McNeil, 1981).

No presente trabalho ficou demonstrado que o efeitos das soluções hiperosmóticas de NaCl e de sacarose são também potencializados em determinadas frequências. Como no caso do efeito inotrópico da metoxamina (Endoh & Shumann, 1975), a solução hiperosmótica de NaCl exibiu aumento de força nas baixas e redução de força nas altas frequências.

Uma questão naturalmente apresentada para se discutir o efeito inotrópico das soluções hiperosmóticas é quanto ao seu efeito cronotrópico. Como as soluções hiperosmóticas afetariam a frequência espontânea uma vez que modificações na frequência também modificariam a força? Este assunto é também controverso, quando se observa diferentes espécies animais, contudo Bassani et alii (1983) determinaram em tecido auricular direito isolado de rato, ^{que} soluções hiperosmóticas tanto de sacarose quanto de NaCl exercem efeito cronotrópico negati-

vo. Neste caso, para ambos os solutos, a redução de frequência espontânea a partir da frequência normal (300 contrações/minuto) levaria a uma potencialização do efeito inotrópico (vide fig.10 neste trabalho). No entanto, a redução de frequência produzida por estes solutos é relativamente pequena (60 a 70 contrações/minuto) o que não seria suficiente para eliminar o efeito inotrópico negativo da solução hiperosmótica de NaCl.

5.3 Curso temporal do efeito de soluções hiperosmóticas sobre o tecido auricular esquerdo isolado de rato.

Identificadas uma dose e uma frequência nas quais se obteve claramente efeito inotrópico negativo para o NaCl e positivo para a sacarose, pôde-se estudar os fatores envolvidos na gênese do efeito das soluções hiperosmóticas de NaCl.

A determinação do curso temporal do efeito das soluções hiperosmóticas trouxe informações importantes, em especial para o estudo da solução hiperosmótica de NaCl. O conhecimento de que a resposta a uma mudança rápida e mantida da solução controle do banho para uma solução hiperosmótica de NaCl produz uma resposta oscilante no tempo, que inclui uma queda rápida de T_{max} para cerca de 50% do seu valor inicial, seguida de recuperação e, posteriormente, estabilização em um valor final que, na frequência de 64 est./min., fica abaixo do nível

controle, é de grande importância para a padronização de futuros experimentos. A tomada das medições 10 minutos após a aplicação do NaCl indicaria inexistência de efeito inotrópico na frequência de 64 est./min. (vide fig. 10), enquanto que 8 minutos antes ou 5 minutos após, seriam encontrados efeitos inotrópicos negativos com magnitudes totalmente diferentes.

Aumentar a osmolalidade por aumento da concentração de NaCl da solução, implica no estabelecimento de pelo menos dois fatores antagônicos, já estabelecidos na literatura, para produção de efeito inotrópico sobre o músculo cardíaco: o aumento da concentração extracelular de Na^+ , que tenderia a reduzir a força de contração (Mullins, 1981; Blaustein & Nelson, 1982) e o aumento de osmolalidade, que por sua vez, tenderia a aumentar a força contrátil (Koch-Weser, 1963; Wildenthal et alii, 1969; Crie et alii, 1976; Willerson et alii, 1978)). A ação simultânea destes dois fatores poderia causar uma variação temporal transitória compatível com aquela descrita no presente trabalho (vide item 4.3). A observação da figura 14, sugere que uma vez que no início da aplicação da solução hiperosmótica o efeito osmótico sobre T_{max} é pequeno, predominaria o efeito inotrópico negativo do aumento da concentração extracelular de Na^+ . A medida que o efeito osmótico se tornasse maior (a partir do segundo minuto) uma mudança no comportamento se estabeleceria iniciando a fase de recuperação de T_{max} . O equilíbrio entre os fatores antagônicos definiria o valor final de regime.

A idéia de que a fase de recuperação da resposta inotrópica

as soluções hiperosmóticas de NaCl, estaria sendo causada pelo efeito osmótico já foi considerada anteriormente por outros autores (Tillish & Langer, 1974) e foi descartada em favor da hipótese^{de} que a recuperação da força seria determinada pelo aumento da concentração intracelular de Na^+ . Os autores puderam demonstrar que, nesta fase, há aumento do influxo de íons sódio, o que causaria, posteriormente, um aumento da concentração intracelular de íons cálcio e, consequentemente, da tensão desenvolvida pelo músculo cardíaco. Foi relatado ainda, que a taxa de recuperação da tensão aumentava a medida que houvesse aumento da frequência estimulatória, fato que foi considerado como apoio à idéia de que íons sódio entrando a cada contração produziriam elevação da atividade intracelular de sódio reduzindo a saída de íons cálcio (Tillish & Langer, 1974; Orchard & Lakatta, 1985).

No presente trabalho, a taxa de recuperação de T_{max} obtida em miocárdio isolado de rato, sofreu elevação com o aumento da frequência estimulatória (vide fig. 19), sugerindo também, dependência da quantidade de íons sódio adentrando a célula a cada contração. Contudo, um fato inédito detectado foi que a recuperação de T_{max} só ocorreu quando o aumento da concentração extracelular de NaCl foi acompanhado de aumento concomitante de osmolalidade (fig. 21). Isto pode estar sugerindo que o mecanismo de transporte responsável pelo influxo de Ca^{++} subsequente ao influxo de Na^+ seja dependente da osmolalidade do meio. Com isto sugere-se que estudos futuros da relação sódio-cálcio, com incrementos na concentração extracelular de sódio, sejam realizados em condições hipo, iso e hiperosmóticas.

O efeito inotrópico negativo inicial causado pela solução hiperosmótica de NaCl foi de grande intensidade e duração (vide fig. 10). Um efeito de tal magnitude (redução de 50% da força e recuperação só após 5 minutos) certamente teria influência marcante nos parâmetros cardiovasculares se presente no animal vivo. Por esta razão e pelo interesse no potente efeito inotrópico negativo de uma substância que está presente em grande quantidade no organismo, procurou-se determinar não só possíveis fatores que estariam agindo na fase de recuperação de Tmax, como também possíveis responsáveis pela queda de Tmax.

O candidato natural a responsável pela queda inicial de Tmax após aplicação das soluções hiperosmóticas de NaCl, seria o aumento da concentração extracelular de Na⁺. Esta hipótese foi apoiada, no presente trabalho, com base nos seguintes dados: a) a queda de Tmax não foi causada por liberação de acetilcolina das terminações^{nervosas}, existentes na preparação, uma vez que, o bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos com fenoxibenzamina não aboliu a resposta (vide fig.16); b) a substituição do cloreto de sódio por cloreto de colina aboliu a queda de Tmax (vide fig.17); e c) o efeito inotrópico negativo da solução hiperosmótica de NaCl foi dependente da quantidade relativa entre os dois íons sódio e cálcio (vide figs. 18 e 21)

Com o bloqueio dos receptores alfa e beta adrenérgicos e colinérgicos pôde-se mostrar que a queda inicial de Tmax na presença do NaCl não foi causada por ação da acetilcolina e que o aumento de Tmax

por influência da solução hiperosmótica de sacarose não foi causado por ação da noradrenalina liberada pela preparação. Contudo, um efeito depressor da força contrátil, provavelmente causado pela acetilcolina, foi constatado a partir de 10 a 15 minutos após aplicação das soluções hiperosmóticas de sacarose. Este efeito não foi significativo no caso do NaCl, mas foi altamente significativo no caso da sacarose (vide fig. 16). É importante notar, no entanto, que o efeito inotrópico positivo do aumento de osmolalidade ocorreu em preparações que não sofreram pré-tratamento, mesmo na presença de uma possível ação colinérgica no sentido de reduzir a força contrátil.

Embora o aumento de osmolalidade pareça ser necessário para ocorrência da fase de recuperação após aplicação da solução hiperosmótica de NaCl, o aumento de T_{max} após aplicação da solução hiperosmótica de sacarose parece se processar por um mecanismo diferente, uma vez que a taxa de aumento de T_{max}, neste caso, foi independente da frequência (vide fig. 20). Isto sugere que a recuperação de T_{max}, após a aplicação da solução hiperosmótica de NaCl, se processe de maneira mais complexa do que a simples adição dos efeitos inotrópico negativo do aumento da concentração extracelular de íons sódio, e positivo do aumento de osmolalidade.

5.4 Estequiometria da troca Na⁺/Ca⁺⁺ em tecido cardíaco isolado de rato.

O mecanismo de troca sódio-cálcio se constitui em importante fator para a homeostase do cálcio celular (Blaunstein & Nelson,

1982), tendo como principal função retirar cálcio do interior das células (Mullins, 1981; Blaunstein & Nelson, 1982). Contudo, operando no chamado "modo reverso" a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ é responsável por um terço do aporte de cálcio necessário para a contração do músculo cardíaco (Mullins, 1981).

A partir da proposta inicial de Wilbrandt & Koller (1948) de que dois íons sódio, para cada íon cálcio são transportados através da membrana celular cardíaca pelo mecanismo de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, e das leis clássicas da termodinâmica pôde-se determinar uma relação (vide item 1 deste trabalho) entre as concentrações intra e extracelular de Na^+ e de Ca^{++} , levando-se em conta que a energia ^{usada} para o transporte seja o próprio potencial eletroquímico do íon sódio (Mullins, 1981; Blaunstein & Nelson, 1982).

No caso específico de transporte não eletrogênico a relação entre as concentrações intra e extracelular de Na^+ e Ca^{++} se reduz à equação (3) que pode ser reescrita como:

$$\frac{[\text{Ca}^{++}]_o}{([\text{Na}^+]_o)^2} = \frac{[\text{Ca}^{++}]_i}{([\text{Na}^+]_i)^2} \quad (4)$$

Tem sido demonstrado (Wilbrandt & Koller, 1948; Katz, 1975)

que a tensão máxima (Tmax) desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado é proporcional à relação $[Ca^{++}]_o / ([Na^{+}]_o)^2$. Por outro lado, vários pesquisadores (Philipson et alii, 1980; Nishimoto, 1980; Kadoma et alii, 1981; Mullins, 1981; Reeve & Hale 1984) tem defendido que o transporte é feito de modo eletrogênico com n maior do que 3 (tipicamente 4 Na⁺ / 1 Ca⁺⁺).

No presente trabalho, o aumento da concentração extracelular de íons cálcio visando manter constante a relação $[Ca^{++}]_o / ([Na^{+}]_o)$ durante a aplicação da solução hiperosmótica de NaCl, produziu um resultado diferente do esperado: a "eliminação" do efeito da troca Na⁺/Ca⁺⁺ deveria produzir um valor final de Tmax próximo daquele obtido com a solução hiperosmótica de cloreto de colina ou de sacarose (vide figs. 17 e 18), considerando que o efeito osmótico, por si só, não alterasse o transporte. Como o valor final de Tmax foi menor que o valor esperado foram desenvolvidos experimentos cujos resultados estão apresentados na tabela XVI, quadro 32, visando verificar, a estequiometria do processo de transporte de Na⁺ / Ca⁺⁺ em condições iso e hiperosmóticas (vide item 3.8 f, pag. 38, deste trabalho).

Os resultados obtidos (vide item 4.4 deste trabalho) apontaram uma redução no número de íons Na⁺ transportados, para cada íon cálcio, quando a solução que banha o tecido é feita hiperosmótica. O mecanismo pelo qual este valor foi alterado não pode ser descrito com os dados disponíveis no presente trabalho. Este resultado sugere fortemente que pesquisas futuras sejam realizadas para elucidação deste fato, uma vez que, aparentemente o comportamento de um

mecanismo de grande importância na regulação das concentrações celulares de Na^+ e de Ca^{++} , em especial nas células cardíacas parece estar sendo afetado na condição de hiperosmolalidade, situação que é imposta em diversos tipos de tratamentos, em especial no tratamento do choque hemorrágico com soluções hiperosmóticas de NaCl, e pode ainda estar presente no organismo, fisiologicamente ou causada por inúmeras patologias.

Finalmente, de volta ao problema que motivou o presente trabalho, pode-se comentar, a título de especulação, que se há aumento de inotropismo, avaliado pela medida da pressão diferencial, durante o tratamento do choque hemorrágico com soluções hiperosmóticas de NaCl (Velasco et alii, 1983), este aumento não deve estar sendo causado por ação direta da solução hiperosmótica de NaCl.

6. CONCLUSÕES

Com base no estudo do efeito inotrópico das soluções hiperosmóticas (SH) de NaCl, em tecido atrial esquerdo isolado de rato, e visando o objetivo específico do presente trabalho, concluiu-se que, na preparação estudada:

- 1- O efeito inotrópico das SH de NaCl é altamente complexo envolvendo dependência da frequência estimulatória, da osmolalidade, do tempo após aplicação e a necessidade de medição de vários parâmetros da contração para sua adequada caracterização;
- 2- As SH de NaCl podem produzir efeito inotrópico negativo ou positivo, dependendo da frequência estimulatória e da osmolalidade da solução, para frequências de 1 a 256 est./min. e osmolalidades de 350 a 500 mOsm/l. Nestas mesmas faixas de frequências e osmolalidades as SH de sacarose apresentam efeito inotrópico sempre positivo. Relações de dose-dependência são condicionadas à frequência para ambos os solutos;
- 3- Transitoriamente as SH de NaCl podem produzir rápida e pronunciada redução (de até 50% do valor inicial), seguida de uma fase de recuperação da tensão máxima (Tmax) desenvolvida pelo tecido. A re-

dução inicial de T_{max} é causada pelo aumento da concentração externa de íons Na^+ . A fase de recuperação, por sua vez, tem sua ocorrência condicionada ao incremento de osmolalidade produzido pela aplicação da SH de NaCl;

- 4- A hiperosmolalidade reduz a estequiometria da troca Na^+/Ca^{++} , o que significa uma redução no número de íons Na^+ para cada íon Ca^{++} transportado, podendo influir no efeito inotrópico das SH de NaCl.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGARWALL, J. B.; BAILE, E. M. & PALMER, W. H. (1969)

Reflex systemic hypotension due to hypertonic solutions in pulmonary circulation. J. Appl. Physiol., 27 (2): 251-5.

- ALBRIGHT, A. L.; LATCHAW, R. E. & ROBINSON, A. G. (1984)

Intracranial and systemic effects of osmotic and oncotic therapy in experimental cerebral edema. J. Neurosurg., 60 (3): 481 - 9.

-ANDERSON P.A.W.; MANRING, A. & JOHNSON, E. A. (1973)

Force-frequency relationship. A basis for a new index of cardiac contractility? Circ. Res., 33: 665-70.

-ANDERSON P.A.W.; RANKIN, J.S.; ARENTZEN, C.E.; ANDERSON, R. W. & JOHNSON, E. A. (1976)

Evaluation of the force-frequency relationship as a descriptor of the inotropic state of canine left ventricular myocardium. Circ. Res. 39(6): 832-39

- ATIKINS, J. M.; WILDENTHAL, K. & HORWITZ, L. D. (1973)

Cardiovascular responses to hyperosmotic manitol in anesthetized and

conscious dogs. Am. J. Physiol., 225 (1): 132.

- BAKER, P. F.; BLAUSTEIN, M. P.;

HODGKIN, A. L. & STEINHARDT, R. A. (1969)

The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J. Physiol.
(Lond.), 200: 431 - 58.

- BASSAN, M.; GANZ, W.; MARCUS, H. S. & SWAN, H. J. C. (1975)

The effect of intracoronary injection of contrast medium upon coronary
blood flow. Circulation, 51: 442 - 5.

- BASSANI, J. W. M. & ROCHA-E-SILVA JR., M. (1983)

Effect of hyperosmotic solutions of NaCl on the spontaneous frequency of
the rat isolated right atrium. Brazilian J. Med. Biol. Res., 16 (5-6):
391

- BASSANI, J. W. M.; TURRIN, M. Q. A. & ROCHA-E-SILVA JR., M. (1986)

Efeito da frequência estimulatória sobre a força contrátil de tecido
cardíaco isolado de rato. Anais do V Congresso Argentino de Bioengenharia
ria, II Encontro Latino Americano de Engenharia Biomédica, Parana - En-
tre Rios, Argentina, 16-19 de setembro, pp.50

- BENFORADO, J. M. (1958)

Frequency-dependent pharmacological and physiological effects on the
rat ventricle strip. J. Pharmacol. Exp. Ther. 122: 82 - 100.

- BERS, D. M.; PHILIPSON, K. D. & NISHIMOTO, A. Y. (1980)

Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. Biochim. biophys. Acta, 601, 358-71.

- BESSE, J. C. & FURCHGOTT, R. F. (1976)

Dissociation constants and relative efficacies of agonists acting on alfa-adrenergic receptors in rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Therap., 197: 66.

-BLAUNSTEIN, M. P. & NELSON, M. T. (1982)

Sodium-calcium exchange: Role in the regulation of cell calcium, in Membrane Transport of Calcium, Ernesto Carafoli, ed., London, Ed. Academic Press, pp. 217.

- BLINKS, J. R. (1965)

Convenient apparatus for recording contractions of isolated heart muscle. J. Appl. Physiol., 20: 755-57.

- BLINKS, J. R. & KOCH-WESER, J. (1961)

Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. J. Pharmacol. Exp. Ther., 134: 373-89.

- BLINKS, J. R. & KOCH-WESER, J. (1963)

Physical factors in the analysis of the action of drugs on myocardial contractility. Pharm. Rev., 15: 531 - 99.

- BO, G.; HAUGE, A. & NICOLAYSEN, G. (1970)

Hyperosmolarity and pulmonary vascular capacitance. J. Physiol., 207:

88 - 9.

- BRIAN, F. H. & KELLY, J. J. (1959)

Effects of rate and rhythm on contraction of rat papillary muscle. Am. J. Physiol. 197 (6): 1199 - 204.

- CHAPMAN, R. A. & ELLIS, D. (1977)

The effects of manganese ions on the contraction of the frog's heart. J. Physiol. (Lond.), 272: 331 - 54

- CRIE, J. S.; WILDENTHAL, K.; ADCOCK, R.; TEMPLETON, G. & WILLERSON, J. T. (1976)

Inhibition of inotropic effect of hyperosmotic mannitol by lactate in vitro. Am. J. Physiol., 231 (4): 1209.

- De FELIPPE JR., J.; TIMONER, J.; VELASCO, I. T.; LOPES, O.U. & ROCHA-E-SILVA JR., M. (1980)

Treatment of refractory hypovolemic shock by 7.5% sodium chloride injections. The Lancet (8): 1002 - 4.

- DIBONA, D. R. & POWELL, JR., W. J. (1980)

Quantitative Correlation between Cell Swelling and Necrosis in Myocardial Ischemia in Dogs. Circ. Res., 49: 653 - 65.

- ENDOH, M. & SHUMANN, H. J. (1975)

Frequency-dependence of the positive inotropic effect of methoxamine and Naphazoline mediated by alfa-Adrenoceptors in the isolated rabbit

papillary muscle. Naunyn - schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 287: 377 - 89.

- ERICSON, A. C. & SJOQUIST, M. (1982)

Efferent renal nerve activity during intracarotid and intracerebroventricular infusions of hypertonic sodium chloride solutions and isotonic volume expansions in the rat. Acta Physiol. Scand., 114: 9 - 15.

- FISHER, H. W. & THOMSON, K. R. (1978)

Contrast media in coronary arteriography: A review. Invest. Radiol. 13:450

- FLORES, J.; DIBONA, D. R.; BECK, C. H.; and LEAF, A. (1972)

The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. J. Clin. Invest., 51: 118 - 26.

- FORESTER, G. V. & MAINWOOD, W. (1974)

Interval dependent inotropic effects in the rat myocardium and the effect of calcium. Pflügers Arch. 352: 189 - 96.

- FURCHGOTT, R. F. & BURSZTYN, P. (1967)

Comparison of dissociation constants and relative efficacies of selected agonists acting on parasympathetic receptors. Annals NY Acad. Sci. 144: 882 - 99.

- GAZITUA, S.; SCOTT, J. B.; CHOU, C. C. & HADDY, F. J. (1969)

Effect of osmolarity on canine renal vascular resistance. Am. J.

Physiol., 217 (4): 1216 - 23.

- GAZITUA, S.; SCOTT, J. B. & HADDY, F. J. (1971)

Resistance responses to local changes in plasma osmolality in three vascular beds. Am. J. Physiol., 220 (2): 384 - 91.

- GERBER, J. G.; BRANCH, R. A.; NIES, A. S.; HOLLIFIELD, J. W. & GERKENS, J. F. (1979)

Influence of hypertonic saline on canine renal blood flow and renin release. Am. J. Physiol., 237 (6): F441 - 6.

- GLITSCH, H. G.; REUTER, H. & SCHOLZ, H. (1970)

The effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. J. Physiol., (Lond.), 209: 25 - 43.

- GODT, R. E.; KIRBY, A. C. & GORDON, A. M. (1984)

Effects of hypertonic solutions on contraction of frog muscle fibres. Am. J. Physiol., 246: C148 - 53.

- GOETHALS, M. A.; ADELE, S. M. & BRUTSAERT, D. C. (1975)

Contractility in mammalian heart muscle. Calcium and osmolality. Circ. Res., 36: 27 - 33.

- GUYTON, A. C. (1973)

Líquidos do organismo: Equilíbrio entre os líquidos extracelular e intracelular, in Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 362.

- GUZMAN, S.V. & WEST, J. W. (1959)

Cardiac effect of intracoronary arterial injection of various roentgenographic contrast media. Am. Heart J. 58; 597

- HAUGE, A. & BO, G. (1971)

Blood hyperosmolarity and pulmonary vascular resistance in the cat. Circ. Res., 28: 370 - 6.

- HAWKINS, D. F. (1962)

Studies on veratrum alkaloid XXXIV. Actions of veratramine on spontaneously beating Guinea-pig atrium preparations. J. Pharm. Exp. Ther., 137: 306 - 12.

- HILBRAND, J. H. (1979)

Forum on osmosis.II. A criticism of "solvent tension" in osmosis. Am. J. Physiol., 273 (3): R108 - 9.

- HOFFMAN, B. F. & KELLY, J. J. JR (1959)

Effects of rate and rhythm on contraction of rat papillary muscle. Am. J. Physiol. 197 (6): 1199 - 1204.

- HORACKOVA, M. & VASSORT, G. (1979)

Sodium - calcium exchange in regulation of cardiac contractility. Evidence for an eletrogenic, voltage - dependent mechanism. J. Gen. Physiol. 73 (4): 403

- HOWARTH, J. V. (1958)

The behavior of frog muscle in hypertonic solutions. J. Physiol. (Lond.), 144: 167 - 75.

- INGLESBY, T. V.; RAIZNER, A. E.; HANLEY, H. G. & SKINNER JR., N. S. (1972)

Cardiovascular reflexes induced by selectively altering pulmonary arterial osmolarity. Am. J. Physiol., 222 (2): 302 - 7.

- JARHULT, J.; HILLMAN, J. & MELLANDER, S. (1975)

Circulatory effects evoked by physiological increases of arterial osmolality. Acta Physiol. Scand., 93: 129 - 34.

- JUNDT, H.; PORTIZIG, H.; REUTER, H. & STUCKI, J. W. (1975)

The effect of substances releasing intracellular calcium ions on sodium-dependent calcium efflux from guinea-pig auricles. J. Physiol. (Lond.), 246: 229 - 53.

- KADOMA, M.; FROELICH, J.; SUTKO, J. & REEVES, J. (1981)

Mechanism of Na^+ for Ca^{++} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles studies by stopped - flow spectrophotometry. Biophys. J., 33 (2,Pt.2): 46a

- KATZ, A. M. (1977)

Myocardial Contractility: Force, velocity, length and time; in Physiology of the Heart, New York, Ed. Raven Press, p.161.

- KEPPEL, G. (1982)

Design and Analysis: A Researcher's Handbook, 2nd ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc. p 513.

- KEDEM, J.; MAHLER, Y. & ROGEL, S. (1969)

The effect of heart rate on myocardial contractility during single and paired pulse stimulation "in vivo". Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 77: 880 - 92.

- KOCH-WESER, J. (1963)

Influence of osmolarity of perfusate on contractility of mammalian myocardium. Am. J. Physiol., 204 (6): 957 - 62.

- KOCH-WESER, J. & BLINKS, J. R. (1962)

Analysis of the relation of the positive inotropic action of cardiac glycosides to the frequency of contraction of heart muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther., 136: 305 - 17.

- KOCH-WESER, J. & BLINKS, J. R. (1963)

The influence of the interval between beats on myocardial contractility. Pharm. Rev., 15: 601 - 52.

- KOCH-WESER, J. (1963)

Effect of rate changes on strength and time course of contraction of papillary muscle. Am. J. Physiol., 204(3): 451 - 57.

- KONZENY, G. A.; MURDOCK, D. K.; EULER, D. E.; HANO, J. E.; SCALON, P.

J.; BANSAL, V. K. & VERTUNO, L. L. (1985)

"In vivo" effects of accute changes in osmolality and sodium concentration on myocardial contractility. Am. Heart J., 109(2): 290 - 6.

- LASSITER, W. E.; GOTTSCHACK, C. W. (1978)

Volume e composição dos líquidos orgânicos. In Fisiologia Médica, vol. 2, 13a. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, V.B. Mountcastle (ed.), pp. 1051 - 66.

- LATTA, T. (1832)

Treatment of malignant cholera. The Lancet 2: 183.

- LEE, C.O.; ABETE, P.; PECKER, M.; SONN, J.K. & VASSALLE, M. (1985)

Strophantidin Inotropy: Role of intracelular sodium ion activity and sodium-calcium exchange. J. Mol. Cell Cardiol., 17:1043 - 53.

- LIANG, C. S. & HOOD JR., W. B. (1978)

Mechanism of cardiac output response to hypertonic sodium chloride infusion in dogs. Am. J. Physiol., 235 (1): H18

- LOPES, O. U.; PONTIERI, V.; ROCHA-E-SILVA JR., M. & VELASCO, I. T. (1980)

Haemodynamic effects of hypertonic NaCl infusions during hemorrhagic shock. J. Physiol. (Lond.), 301: 64 - 5.

- LUNDVALL, J. (1972)

Tissue hyperosmolality as a mediator of vasodilatation and transcapil-

lary fluid flux in exercising skeletal muscle. Acta physiol. scand.
sup.379: 1 - 10.

- LUNDVALL, J.; MELLANDER, S.; WESTLING, H. & WHITE, T. (1972)

Fluid transfer between blood and tissues during exercise. Acta Phisiol.
Scand., 85: 258 - 69.

- LÜTTGAU, H. C. & NIEDERGERKE, R. (1958)

The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. J. Physiol.-
(Lond.), 143: 486 - 05.

- MACKNIGHT, A. D. C. & LEAF, A. (1977)

Regulation of the celular volume. Physiol. Rev., 57: 510 - 73.

- MANERY, J. (1954)

Water and eletrolyte metabolism. Physiol. Rev. 40: 112 - 7.

- MANRING, A. & HOLLANDER, P. B. (1971)

The interval-strength relationship in mammalian atrium: a calcium ex-
change model. Biophys. J., 11: 483 - 501.

- MEIJLER, F. L. (1962)

Staircase, rest contractions, and potentiation in the isolated rat
heart. Am. J. Physiol., 202(4): 636 - 40.

- MEIJLER, F. L.; BOGAARD, F.; TWEEL, L. H. & DURRER, D. (1962)

Postextrasystolic potentiation in the isolated rat heart. Am. J.

Physiol., 202 (4): 631 - 35.

- MELLANDER, S. (1973)

Osmolar control of the Circulation. Acta Physiol. Scand., suppl. 396, 40: 375.

- MILNOR, R. W. (1980)

Properties of Cardiac Tissue, in Medical Physiology, 14a. ed., The C. V. Mosby Company, London. Vernon B. Mountcastle (ed.), pp 345.

- McDOWALL, R. J. S.; MUNRO, A. F. & ZAYAT, A. F. (1955)

Sodium and Cardiac Muscle. J. Physiol., (Lond.), 130: 615 - 24.

- MUDGE, G. H. (1980)

Water, salts, and ions, in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6a. ed., MacMillan Publishing Co., Inc., London. Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman & Alfred Gilman (eds.), pp 848.

- MULLINS, L. J. (1979)

The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. Am. J. Physiol., 236 (2): C103.

- MULLINS, L. J. (1981)

Depolarization and the generation of tension, in Ion Transport in Heart, New York, Ed. Raven Press Books Ltda, pp. 108.

- MUIRHEAD, E. E.; LACKEY, R. W.; BUNDE, C. A. & HILL, J. M. (1947)

Transient hypotension following rapid intravenous injections of hypertonic solutions. Am. J. Physiol., 151: 516 - 24.

- NAYLER, W. G. (1961)

Influence of hypertonic solutions on ventricular contractile activity. Am. J. Physiol. 201 (4): 682 - 6.

- NIEDERGERKE, R. & LÜTTGAU, H. C. (1957)

Calcium and the contraction of the heart. Antagonism between calcium and sodium ions. Nature (Lond.), 179: 1066 - 7.

- ORCHARD, G. H. & LAKATTA, E. G. (1985) Intracellular calcium transients and developed tension in rat heart muscle. A mechanism for the negative interval-strength relationship. J. Gen. Physiol., 86: 637 - 31.

- PENFIELD, W. C. (1919)

The treatment of severe and progressive hemorrhage by intravenous injections. Am. J. Physiol. 48: 121 - 8.

- PHILIPSON, K. D.; BERS, D. M.; NISHIMOTO, A. Y. & LANGER, G. A. (1980)

Binding of Ca and Na to sarcolemmal membranes: relation to control of myocardial contractility. Am. J. Physiol., 238: H373 - 8.

- PHILIPSON, K. D. & NISHIMOTO, A. Y. (1980)

Na⁺/Ca⁺⁺ Exchange is affected by membrane potential in cardiac sarco-

lemmal vesicles. J. Biol. Chem., 255:6880 - 2.

- PIDGEON, J.; LAB, M.; SEED, A.; ELZINGA, G.; PAPADOYANNIS, D. & NOBLE, M. I. M. (1980)

The contractile state of cat and dog heart in relation to the interval between beats. Circ. Res., 47: 559 - 67.

- PIENE, H.; HARSETH, P. & BO, G. (1974)

Plasma hyperosmolality and pulmonary capacitance vessels. Acta Physiol. Scand. 91: 94 - 102.

- PITTS, R. F. (1974)

Volume and composition of the body fluids. In Physiology of the kidney and body fluids, Year Book Medical Publ. Inc., USA, p. 11

- RAIZNER, A. E.; COSTIN, J. C.; CROKE, R. P.; BISHOP, J. B.; INGLESBY, T. V. & SKINNER JR., N. S. (1973)

Reflex, sistemic, and local hemodynamic alterations with experimental hyperosmolality. Am. J. Physiol., 224 (6): 1327 - 33.

- REEVES, J. P. & HALE, C. C. (1984)

The stoichiometry of the cardiac sodium-exchange system. J. Biol. Chem., 259 (12): 7733 - 9.

- REUTER, H. & SEITZ, N. (1968)

The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. J. Physiol., Lond., 195: 451 - 70.

- ROBERTS, L. A. & HUGHES, M. J. (1977)

Chronotropic response of spontaneously beating rabbit atria to hyperosmotic media. Am. J. Physiol., 233 (2): 228 - 33.

- ROWE, G. G.; MCKENNA, D. H.; CORLISS, R. J. & SIALER, S. (1972)

Hemodynamic effects of hypertonic sodium chloride. J. Appl. Physiol., 32: 182 - 4.

- STAINSBY, W. N. & FREGLY, M. J. (1968)

Effect of plasma osmolality on resistance to blood flow through skeletal muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 128: 289 - 7.

- SIEGL, P. K. S. & McNEILL, J. H. (1982)

Positive inotropic responses in cardiac muscles: influence of stimulation frequency and species. Can. J. Physiol. Pharmacol., 60: 33 - 40.

- TILLISCH, J. H. & LANGER, G. A. (1974)

Miocardial mechanical responses and ionic exchange in high-sodium perfusate. Circ. Res., 34: 40 - 50.

- TUCCI, P. J. F. & LOPES, O. U. (1984)

Humoral effects of hyperosmotic NaCl solution (2400 mOsm/l) on cardiac mechanics and coronary flow. Brazilian J. Med. Biol. Res. 17 (5-6):451.

- VELASCO, I. T. (1977)

Choque hemorrágico: efeitos da administração endovenosa de soluções hiperosmolares. São Paulo. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Tese de doutoramento.

- VELASCO, I. T.; PONTIERI, V.; ROCHA-E-SILVA JR., M. & LOPES, O. U. (1980)

Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. Am. J. Physiol., 239: H664 - 73.

- WALFORD, G. D.; GERSTENBLITH, G. & LAKATTA, E. G. (1984)

Effect of sodium on calcium-dependent force in unstimulated rat cardiac muscle. Am. J. Physiol. 246: H222 - H231.

- WILBRANDT, W. & KOLLER, H. (1948)

Die calcium - wirkung an froschherzen als funktion des ionengleichgewichts zwischen zellmembran und umgebund. Helv. Physiol. acta, 6, 208 - 221, apud Lüttgau, H. C. & Niedergierke, R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. ^{J. Physiol. (Lond.)} 143: 486 - 505, 1958.

- WILDENTHAL, K.; SKELTON, C. L. & COLEMAN III, H. N. (1969)

Cardiac muscle mechanics in hypertonic solutions. Am. J. Physiol., 217 (1): 302 - 6.

- WILLERSON, J. T.; CURRY, G. C.; ATKINS, J. M.; PARKEY, R. & HORWITZ, L. D. (1975)

Influence of hypertonic mannitol on ventricular performance and coronary blood flow in patients. Circulation, 51 (6): 1095 - 100.

- WILLERSON, J. T.; WHEELAN, S.; ADCOCK, R. C.;

TEMPLETON, G. H. & WILDENTHAL, K. (1978)

Species differences in responses to hyperosmolality and D600 in cat and rat heart. Am. J. Physiol., 235 (3): H276.

- ZHANG, W.; LI, H. & HO, S. (1983)

Hemodynamics effects following intravenously injecting hyperosmotic solutions in dogs. Acta Physiol. Sin., 35 (4): 466 - 71.

A P P E N D I C E

INDICE

DISPARADOR PROGRAMÁVEL.....	1
A1 - DESCRIÇÃO	
A1.1 - "HARDWARE".....	1
A1.2 - "SOFTWARE"	
a) PROGRAMA MONITOR - SUPERVISOR.....	5
b) PROGRAMA DE CONTROLE DO MODO 0.....	5
c) PROGRAMA DE CONTROLE DO MODO 1.....	5
- EDITOR DE PROGRAMAS DO DP 1.1.....	6
- O COMPILADOR LEC.....	7
d) PROGRAMAS DE CONTROLE DO MODO 2.....	8
A1.3 - OPERAÇÃO E EXEMPLOS DE APLICAÇÃO	
A1.3.1 - OPERAÇÃO NO MODO 0.....	8
A1.3.2 - OPERAÇÃO NO MODO 1.....	10
A1.3.3 - OPERAÇÃO NO MODO 2.....	10
BIBLIOGRAFIA.....	14

APÊNDICE: DISPARADOR PROGRAMÁVEL - DP 1.1 -

A força desenvolvida pelo músculo cardíaco isolado depende da frequência e do ritmo estimulatório a que está submetido (1, 2, 3). Por isso, visando o controle experimental, em estudos da atividade contrátil cardíaca, os pesquisadores tem feito o uso de estimuladores programáveis (e. g. Bloom Ass.mod. 30) e/ou do acoplamento de dois ou mais estimuladores com circuitos elétricos adicionais. Em ambos os casos, contudo, a solução torna-se despendiosa e pouco flexível.

Neste apêndice será descrito um instrumento, denominado DISPARADOR PROGRAMÁVEL, projetado e construído para controlar o processo de distribuição temporal de estímulos elétricos às preparações biológicas.

O controle preciso do processo de estimulação era primordial, no presente trabalho, para garantir a reprodutibilidade dos experimentos biológicos. Além disso, para a realização da relação força-frequência tornou-se imprescindível a construção do DISPARADOR PROGRAMÁVEL, uma vez que não se pôde encontrar no mercado nacional nenhum equipamento que possibilitasse a realização dos experimentos.

A versão DP 1.1 apresentada a seguir inclui recursos que não estavam disponíveis quando o equipamento foi utilizado pela primeira vez. Esta versão foi resultante do trabalho de iniciação científica proposto ao aluno ELMAR FONSECA RODOVALHO JUNIOR e do trabalho de apoio técnico do Engo. ALEXANDRE HENRIQUE HERMINI. Deste modo, preferiu-se apresentar a versão mais atual que contém documentação técnica ("Hardware" e "Software") bem organizada, que pode ser solicitada ao autor. A versão inicial continha apenas as rotinas básicas necessárias para a realização dos experimentos biológicos e foi projetada e construída pelo autor deste trabalho, com apoio do professor EDUARDO TAVARES COSTA.

A1. Descrição do Disparador Programável, mod. DP 1.1

A1.1 "HARDWARE"

A figura A01 contém um diagrama geral do Disparador Programável, dividido em 4 blocos (de A a D) que serão descritos a seguir:

BLOCO A: Este bloco é composto pela Unidade Central de Processamento (UCP) INTEL 8085A. Esta UCP possui barramento de dados de 8 bits e de endereços de 16 bits, podendo endereçar diretamente 64 KBytes de memória e até 256 dispositivos de entrada e saída. A UCP 8085A possui ainda um barramento de controle para sincronismo da UCP com dispositivos externos e um repertório de 4 interrupções mascaráveis por

"software" e uma não mascarável. O oscilador (cristal) usado nesta versão para sincronismo das operações do procesador foi de 6,144 MHz, possibilitando um tempo de execução de instruções de 1 a 3 us.

BLOCO B: Neste bloco se encontram esquematizados os dois tipos de memória utilizados no DP 1.1. Existem disponíveis 2 Kbytes de memória fixa (EPROM - "Erasable Programable Read Only Memory", mod. 2716- Intel Co.) e 1 Kbytes de memória volátil (RAM - "Random Access Memory", mod. 2114 - Intel Co.). Na primeira encontram-se todo o "software" de controle do instrumento e os programas utilitários do sistema. A memória volátil é usada como área de dados do sistema e como área de armazenamento de programas escritos pelos usuários.

BLOCO C: Este bloco é composto basicamente por uma interface de entrada e saída de dados, a PPI("Programable Peripheral Interface") mod. 8255, Intel Co. Esta interface é usada para comunicação do microprocessador com os equipamentos (no caso específico deste trabalho o estimulador elétrico e o osciloscópio) a serem acionados pelo DP 1.1 e com o dispositivo de entrada por onde o usuário fornece dados e programas (Chaves do painel frontal do instrumento).

A PPI8255 possui 24 linhas paralelas de entrada e saída divididas em três portas A,B e C. As portas A e B possuem 8 bits e a porta C é constituída de dois blocos de 4 bits cada. Estas portas podem ser programadas como entrada ou saída separadamente. Existem três modos básicos de programação: modo 0 - as portas A, B e C trabalham como entrada e saída; modo 1 - as portas A e B funcionam como entrada ou saída e a porta C fornece os sinais de controle dessas portas; modo 2 - a porta A será um barramento bidirecional de dados e a porta C será utilizada como controle da porta A. A porta B não é utilizada neste caso. No DP 1.1 a PPI8255 está programada no modo 0. A conexão com os periféricos está ilustrada na figura A02.

BLOCO D: Este bloco é composto pelo ponto de "reset" e pelas interrupções. O "reset" faz com que o sistema seja reinicializado a partir da colocação do valor zero no apontador de instruções. No DP 1.1 o "reset" pode ser acionado por meio de um "pushbotton" quando se desejar e é sempre acionado quando o equipamento é ligado ("reset" automático).

Foram utilizadas três das interrupções mascaráveis do 8085A (RST5.5, RST6.5 e RST7.5) para acionamento dos três modos de operação disponíveis no DP 1.1 (os modos de operação serão descritos, neste apêndice, na descrição do "software" do sistema). A interrupção "TRAP" foi usada como sinal para sincronizar o DP 1.1 com sinais externos.

Ruídos de acionamento espúrio das chaves foram eliminados por "software" ("debouncing" por "software").

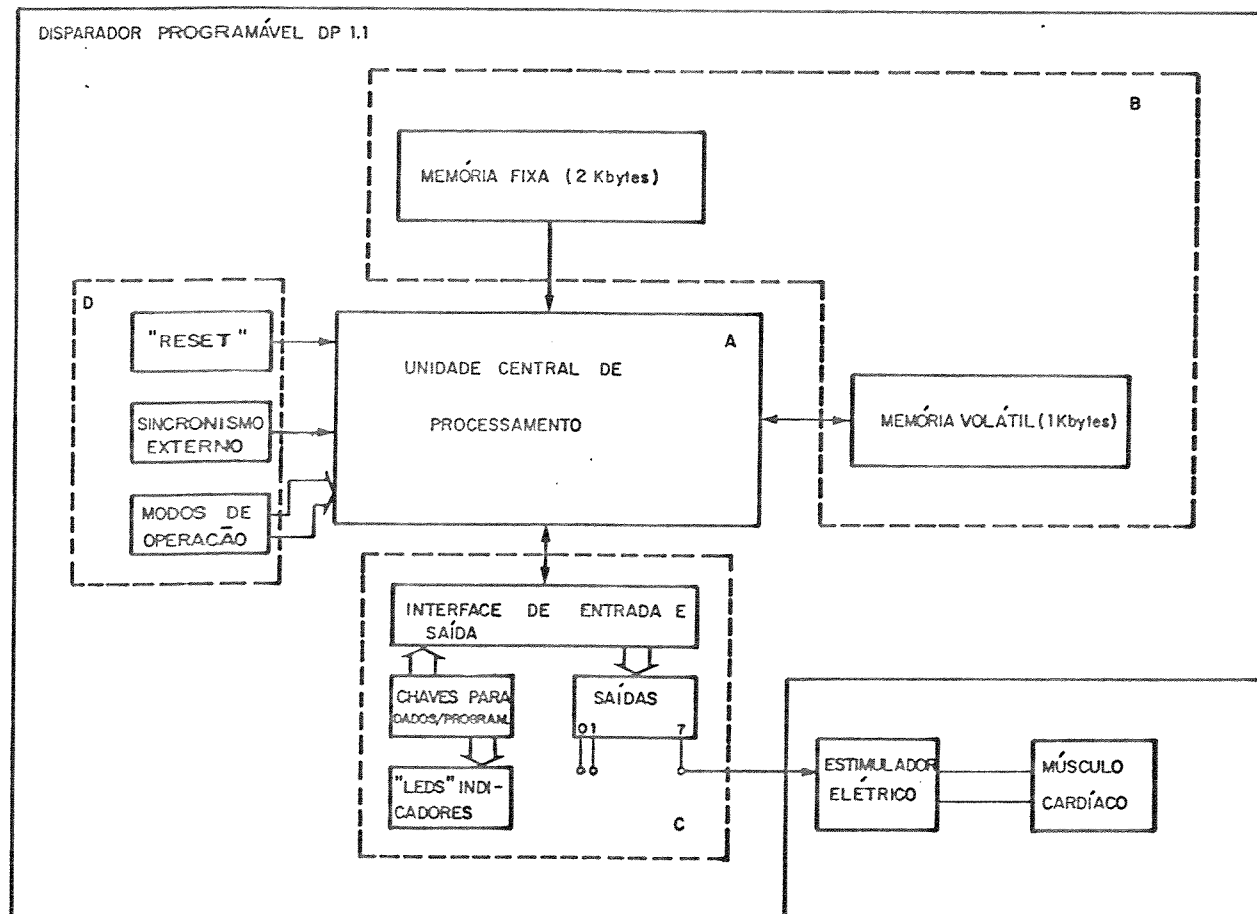


Fig. A01 - Diagrama em blocos do Disparador Programável (DP 1.1)
 A- Processador Central; B- Memórias; C- Entradas e saídas; e D- "Reset", sincronismo externo e selecionamento do modo de operação. A saída 07, nesta figura, está conectada ao "trigger" de um estimulador elétrico.

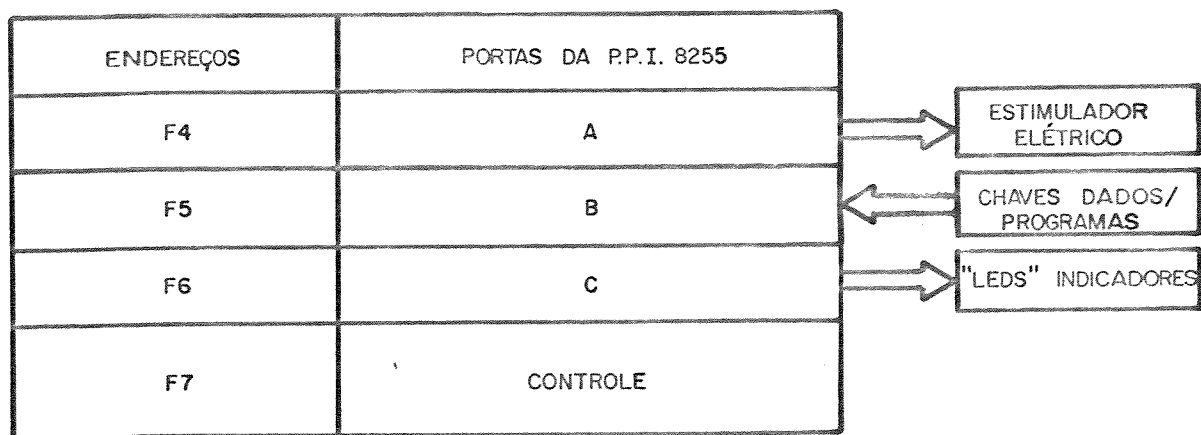


Fig.A02 - Configuração de endereços da Interface PPI 8255 ("Programmable Peripheral Interface", mod.8255), utilizada no DP 1.1, programada no modo 0 (zero).

A1.2 "SOFTWARE"

O "software" disponível no DP 1.1 permite que o instrumento trabalhe em três modos de operação (modo 0, modo 1 e modo 2), nos quais o processador central passa a executar tarefas totalmente distintas atendendo a três classes diferentes de necessidades dos usuários. O "software" residente está dividido em quatro partes:

a) PROGRAMA MONITOR - SUPERVISOR

Este programa é acessado sempre que ocorrer um "reset". A partir daí ele irá processar a inicialização do sistema zerando todos os "flags" e inicializando as variáveis utilizadas nos outros programas, o apontador da pilha ("stack - pointer") e programando a PPI8255. Ao ocorrer uma interrupção o monitor-supervisor desvia o controle para a parte do "software" que trata do modo de operação desejado.

b) PROGRAMA DE CONTROLE DO MODO 0

Neste modo de operação o usuário pode utilizar uma série de programas previamente armazenados na memória fixa do instrumento. Esta parte da memória é reservada ao modo 0 e o DP 1.1 não permite que o usuário a modifique durante qualquer operação. O "software" do modo 0 está dividido em duas partes: i) rotina de seleção de programas e ii) programas utilitários. Ao ser acionado o modo 0 o seguinte algoritmo é processado:

1- Início

Enquanto o modo de operação é 0 (zero)

1.1 se a interrupção 7.5 é acionada, então

1.1.1 lê chaves do painel

1.1.2 se o dado é válido, então

1.1.2.1 calcula endereço do programa

1.1.2.2 inicia a execução do programa

1.1.3 se o dado não é válido, então

1.1.3.1 aciona a rotina de erro, volta ao início

1.2 se a interrupção 7.5 não for acionada, então

1.2.1 fica em estado de "wait"

2- Fim

c) PROGRAMAS DE CONTROLE DO MODO 1

Este modo de operação foi desenvolvido para dar ao DP 1.1 maior versatilidade. Neste modo, o usuário pode elaborar seus próprios programas escritos em uma linguagem especialmente desenvolvida para facilitar a implementação de programas para controlar o processo de estimulação elétrica à preparações biológicas (Linguagem para Es-

timulação Cardíaca, LEC). Para compor esta linguagem foram desenvolvidos cinco grupos de comandos: a) comandos de atribuição; b) comandos aritméticos; c) comandos de repetição; d) comandos de geração de pulsos; e) comandos de geração de atrasos.

Os comandos de atribuição permitem a colocação de valores em 3 localidades da memória volátil (memória do atraso 1, memória do atraso 2 e memória do ritmo básico). O usuário pode atribuir valores no intervalo de 0 a 65535 que irão representar atrasos expressos em milissegundos.

A memória do ritmo básico é usada para se definir o intervalo padrão entre dois pulsos para estimulação, e as memórias dos atrasos 1 e 2 utilizadas para determinar os tempos de ocorrência dentro do ritmo básico.

Com os comandos aritméticos o usuário pode programar incrementos e decrementos dos atrasos variando de 1 a 255 e somar os conteúdos das memórias dos atrasos.

Os comandos de repetição permitem a criação de laços ("loops") no programa. Existem duas condições que podem ser impostas para os comandos de repetição, uma delas é o número de vezes que o laço será executado e a outra é um teste de comparação entre os atrasos 1 ou 2 e o valor definido no argumento. O laço pode ser executado até que o conteúdo da memória do atraso 1 seja maior que o conteúdo da memória do atraso 2.

Os comandos de geração de pulsos são aqueles que produzem pulsos na saída do DP 1.1 para disparo do equipamento a ser controlado (estimulador, osciloscópio, etc). Nesta classe de comandos existem aqueles que geram de 1 a 4 pulsos e aqueles que geram um pulso seguido de um atraso que é igual ao valor colocado, pelo usuário, na memória do ritmo básico.

Os comandos de geração de atrasos utilizam os valores armazenados nas memórias dos atrasos para produzirem os atrasos desejados. A tabela A01 contém todos os comandos com suas respectivas ações semânticas.

Todas as etapas desde a entrada dos programas até a sua execução, estão sob o controle do "software" do MODO 1 que está dividido em duas partes: o EDITOR e o compilador LEC.

O EDITOR DE PROGRAMAS DO DP 1.1

A transferência de comandos e argumentos, bem como sua conferência e/ou modificação é feita por meio do EDITOR. Os códigos dos comandos e seus argumentos são colocados na memória sob a forma de uma tabela que será posteriormente usada pelo compilador LEC. A partição do "software" correspondente ao EDITOR corresponde ao seguinte algoritmo:

- 1- Lê as chaves do painel;
- 2- verifica se o dado lido é um argumento ou um comando;
 - 2.1 se for argumento, armazena-o na memória e volta ao passo 1;
 - 2.2 senão, verifica se é comando válido consultando a tabela de comandos
 - 2.2.1 se o comando é inexistente, aciona a rotina de erro e volta ao passo 1;
 - 2.2.2 senão, armazena o comando na memória;
- 3- verifica o tamanho do comando consultando a tabela de comandos
 - 3.1 se é comando de um byte, zera as "flags" de dados, vai para passo 4;
 - 3.2 se é comando de dois ou três bytes, coloca o valor um nas "flags" de dados;
- 4- verifica se o comando lido é o comando de finalização do programa
 - 4.1 se não, retorna ao passo 1;
 - 4.2 se sim, começa a montagem do programa objeto.

O COMPILADOR LEC

Esta parte do "software" se encarrega de gerar códigos de máquina para as instruções correspondentes a cada comando. A geração dos códigos de máquina é otimizada no LEC pela transferência de instruções já gravadas na memória fixa do DP 1.1 para a memória volátil efetuando em seguida os ajustes necessários, como a colocação de argumentos e endereços de retorno das instruções de repetição.

Existem cinco instruções especiais para orientar o compilador. Os códigos destas instruções são aqueles do 8085A, correspondentes a instruções não utilizadas pelo sistema e neste caso são as instruções de "restart".

O algoritmo geral do compilador LEC é apresentado a seguir:

- 1- Busca código de comando armazenado na memória pelo EDITOR
- 2- calcula o endereço inicial do conjunto de instruções do comando
- 3- busca o código do conjunto de instruções do comando
- 4- verifica se é uma instrução especial
 - 4.1 se for
 - 4.1.1 se for FF, então vai para o passo 5
 - 4.1.2 se for CF, então guarda o endereço da posição livre da memória na pilha. Retornar ao passo 3;
 - 4.1.3 se for D7, então busca o endereço guardado na pilha e coloca-o na memória. Retornar ao passo 3
 - 4.1.4 se for DF, soma o próximo byte do conjunto de instruções com o endereço da posição livre de memória e coloca o resultado na memória. Retornar ao passo 3;
 - 4.1.5 se for C7, transfere o primeiro byte logo após o código do comando armazenado pelo EDITOR, para a memória. Retornar ao passo 3;

- 4.2 se não for instrução especial, armazena o código da instrução na memória
- 5- verifica se o código armazenado é o do comando de finalização do programa
 - 5.1 se for, termina a geração de códigos e montagem
 - 5.2 senão retorna ao passo 1.

Na tabela A - I encontram-se os comandos disponíveis na linguagem LEC, com o número de bytes de memória ocupados pelo comando e sua codificação.

d) PROGRAMAS DE CONTROLE DO MODO 2

Neste modo de operação é permitido ao usuário sincronizar o funcionamento do Disparador Programável com outro evento, ou seja, o DP 1.1 pode receber um sinal de sincronismo e após sua ocorrência disparar um conjunto de pulsos de acordo com uma programação previamente especificada. O programa a ser especificado pode ser: 1) qualquer rotina do MODO 0; 2) um programa escrito pelo usuário e armazenado na memória, utilizando-se do MODO 1. A operação no MODO 2 pode ser entendida com a observação do seguinte algoritmo:

- 1- Lê chaves do painel
- 2- verifica se é rotina do MODO 1
 - 2.1 se for, vai para 3
 - 2.2 se não, verifica se é programa a ser montado com o MODO 2
 - 2.2.1 se for, coloca o microprocessador em estado de espera ("halt")
 - 2.2.2 se não, chama rotina de erro;
- 3- lê chaves do painel
- 4- calcula qual a rotina do MODO 1
- 5- coloca o microprocessador em "halt".

Apresenta-se a seguir um resumo da operação do Disparador Programável com exemplos de sua aplicação ao estudo da atividade contrátil do tecido cardíaco isolado de rato.

A 1.3 OPERAÇÃO E EXEMPLOS DE APLICAÇÃO

A 1.3.1 OPERAÇÃO NO MODO 0

Os passos para operação neste modo são os seguintes:

- 1- selecionar o modo de operação acionando a chave "MODO 0";
- 2- colocar o número da rotina desejada (vide tabela A02) nas chaves do painel;
- 3- acionar novamente a chave MODO 0 para iniciar a execução.

Se o usuário desejar mudar de rotina, mesmo com uma já em execução, basta seguir os passos 2 e 3 acima. Para interromper o funcionamento basta acionar o "reset".

TABELA A - I Comandos disponíveis na linguagem para estimulação cardíaca (LEC). As colunas contém o nome do comando, seu código decimal, o número de bytes do seu argumento e a descrição do comando.

Nome	Cod.	nBA	Descrição do comando
DRB	17	2	Define um ritmo básico com intervalo entre pulsos igual ao valor em milissegundos (ms) contidos no argumento.
DAT1	18	2	Define um atraso cujo tempo será igual ao valor em ms colocado no argumento.
DAT2	19	2	Idem DAT1.
INCAT1	06	1	Incrementa o valor do atraso 1 com o valor contido no argumento.
INCAT2	07	1	Idem ao anterior, para o atraso 2.
DCRAT1	04	1	Decrementa o valor do argumento do atraso 1.
DCRAT2	05	1	Idem anterior, para o atraso 2.
SOMA1	20	0	O atraso 1 passa a valer a soma dos atrasos 1 e 2.
SOMA2	14	0	Idem anterior, porém o atraso 2 conterá a soma.
AT1	08	0	Gera um atraso de duração igual ao valor definido em DAT1.
AT2	09	0	Idem anterior, para DAT2.
CRB	10	0	Gera um atraso de duração igual a diferença entre o valor definido pelo último DRB e a soma dos valores definidos pelos últimos DAT1 e DAT2. Se estes últimos não foram usados a soma terá valor nulo.
PULSE	03	0	Gera um pulso para "trigger".
PULSEN	10	1	Gera n pulsos com intervalo-entre-pulsos de duração igual ao valor definido no último DRB.
PULD	15	2	Gera dois pulsos consecutivos com intervalo entre eles de duração em ms igual ao valor colocado no argumento.
PULT	16	2	Idem ao anterior para tres pulsos.
RPN	01	1	O conjunto de comandos colocados entre um RPN e o comando FDR (comando de finalização) serão executado o número de vezes indicado pelo argumento.
FDR	02	0	Utilizado como indicador do final do conjunto de comandos a ser repetido com o comando RPN.
RPAT	11	2	Repete o conjunto de comandos entre o RPAT e dos comandos finalizadores (FDRAT1 e FDRAT2) até que o valor do atraso 1 ou 2 respectivamente seja maior que o valor estipulado no argumento.
FDRAT1	21	0	Finalizador do comando RPAT, indicando que a condição para repetição será estabelecida pelo atraso 1.
FDRAT2	12	0	Idem anterior, para atraso 2.
EXEC	84	0	Indica que o programa deve ser compilado e executado.
PARE	22	0	Indica que o programa deve ser apenas compilado.

EXEMPLO DE APLICAÇÃO

A figura A03 ilustra o efeito da mudança de uma frequência estimulatória baixa para uma frequência maior e o retorno a frequência inicial em tecido atrial esquerdo isolado de rato.

A 1.3.2 OPERAÇÃO NO MODO 1

- MODO 1;
- 1- selecionar o modo de operação, pelo acionamento da chave
 - 2- transferir os códigos dos comandos para o DP1.1, por meio das chaves do painel;
 - 3- acionar novamente a chave MODO 1;
 - 4- repetir os passos 2 e 3 até que todos os códigos sejam transferidos.

OBS.: Se houver entrada inválida o DP1.1 sinalizará acendendo os tres "leds" indicadores dos modos de operação

EXEMPLO DE APLICAÇÃO

A fig. A04 ilustra um programa escrito na linguagem LEC para geração de uma sequência não regular de estímulos elétricos, incluindo: um ritmo básico, pausas e pulsos triplos. O resultado de sua execução está apresentado na figura A05.

A 1.3.3 OPERAÇÃO NO MODO 2

- 1- acionar a chave MODO 2 ;
- 2- colocar o código 01 (00000001) nas chaves do painel e acionar a chave de MODO 2;
- 3- colocar o número da rotina desejada nas chaves do painel e acionar a chave de MODO 2.

Deste modo um programa previamente disponível na memória fixa do instrumento (qualquer um dos programas que podem ser acessados pelo modo 0) será executado. Caso se deseje gravar um programa novo para ser executado com a chegada do pulso de sincronismo deve-se em primeiro lugar entrar no MODO 1, gravar o programa que deve terminar com o comando PARE. Em seguida entrar no MODO 2 e executar os seguintes passos:

- 1- acionar a chave de MODO 2;
- 2- colocar o código 02 (00000010) nas chaves do painel e acionar a chave de MODO 2.

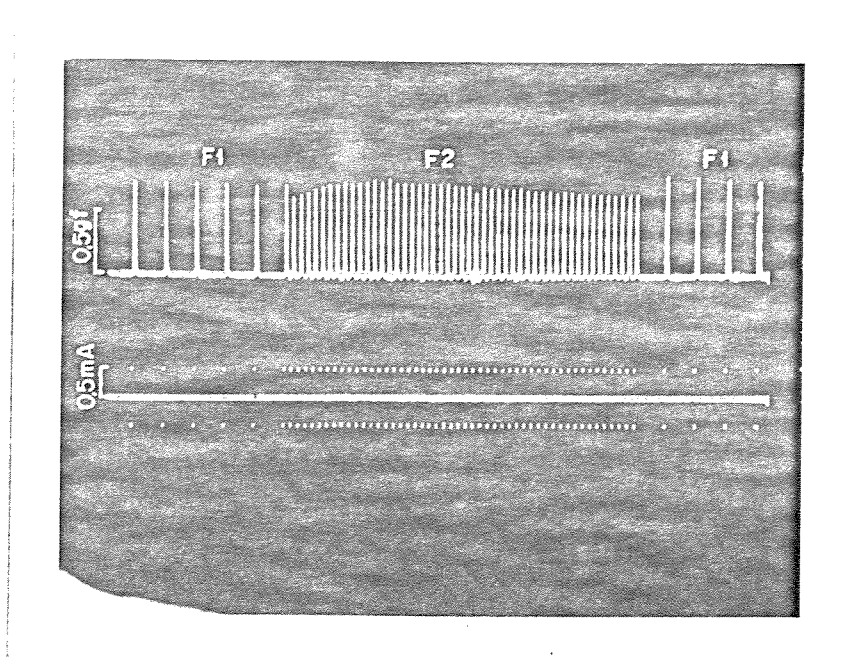


Fig.A03 - Influência da frequência estimulatória sobre a força contrátil desenvolvida pelo tecido cardíaco isolado de rato. A- tensão desenvolvida; B- Estímulo elétrico (mA) aplicado sob controle temporal efetuado pelo DP 1.1; F1- frequência inicial de 64 est./min.; F2- frequência de 256 est./min. As escalas estão apresentadas na figura.

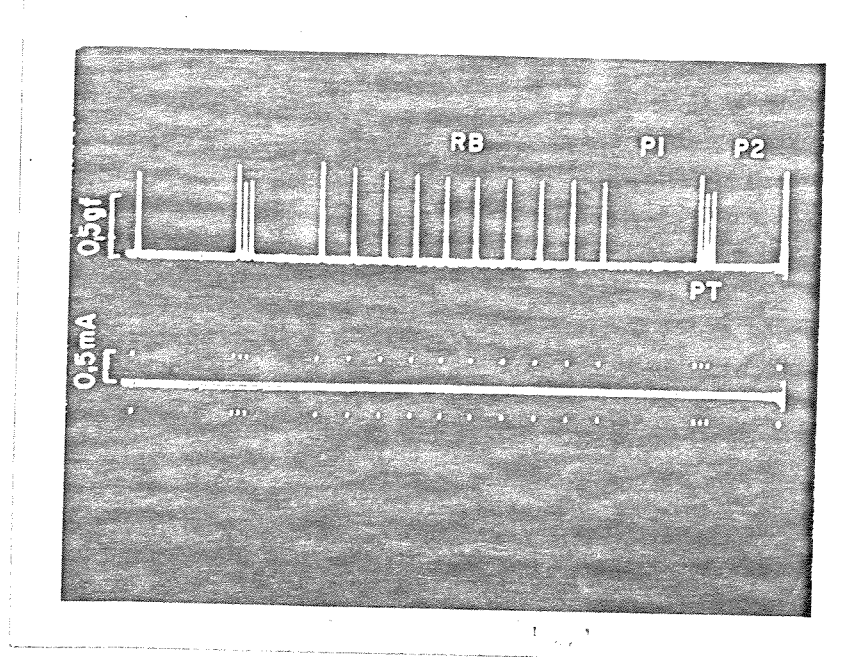


Fig.A05 - Efeito da aplicação de pulsos triplos após uma sequência de estímulos elétricos seguida de uma pausa sobre a tensão desenvolvida pelo tecido cardíaco isolado de rato. Traçados: A, tensão desenvolvida; B, estímulo aplicado (bipolar, duração 5 ms, amplitude 0,5 mA). As escalas estão apresentadas na figura. RB, 1s; PI, 3,2s; P2, 2 s; PT, 0,25 s.

Com isto o DP 1.1 iniciará a execução do programa desejado após o sinal de sincronismo, fornecido externamente como função do ciclo de atividade da preparação em estudo (e.g. ciclo cardíaco).

EXEMPLO DE APLICAÇÃO

Para o MODO 2 não serão apresentados exemplos de aplicação, uma vez que, envolveria a necessidade de construção de um "hardware" auxiliar para geração do sinal de sincronismo e não faz parte do escopo do presente trabalho. Os testes de bancada que se mostraram plenamente satisfatórios.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON P. A. W.; RANKIN, J. S.; ARENTZEN, C. E.; ANDERSON, R. W. & JOHNSON, E. A. (1976)
Evaluation of the force-frequency relationship as a descriptor of the inotropic state of canine left ventricular myocardium. Circ. Res. 39 (6): 832 - 39.
2. BLINKS, J. R. & KOCH-WESER, J. (1961)
Analysis os the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility. J. Pharm. Rev., 15: 531 - 99.
3. KOCH-WESER, J. & BLINKS, J. R. (1963)
The influence of the interval between beats on myocardial contractility. Pharm. Rev., 15: 601 - 52.
4. COSTA, E. T. (1984)
Desenvolvimento de um promediador para processar potencial neural e-vocado. Campinas. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Campinas. Tese de mestrado.

REFERENCIAS TÉCNICAS

- "8080/8085 ASSEMBLY Language Programming"
Intel Co., Santa Clara, CA.
- "PERIPHERAL Design Handbook" (1980)
Intel Co., Santa Clara, CA.
- "THE TTL Data Book for Design Engineers" (1978)
Texas Instruments Inc., Dallas, Texas.