

C2

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por: <u>Nivaldo Zafalon</u>	
<u>Químico</u>	e aprovada pela Comissão
Julgada em: <u>17/11/2006</u>	<u>JCS</u> Orientador

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

Departamento de Engenharia Biomédica

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TAQUIARRITMIA
ATRIAL INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA
FREQUÊNCIA**

Autor: Nivaldo Zafalon Junior

Orientadores: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani (DEB/FEEC/UNICAMP - Presidente)

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa (DEB/FEEC/UNICAMP)

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior (DCM/FCM/UNICAMP)

Prof. Dr. Dalmo Antonio Ribeiro Moreira (INCOR)

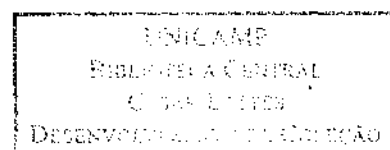
Prof. Dr. Vera Lucia da Silveira Nantes Button (DEB/FEEC/UNICAMP)

Prof. Dr. Antônio Augusto Fasolo Quevedo (DEB/FEEC/UNICAMP)

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

Campinas, Novembro de 2006

S.P. – Brasil



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	T/UNICAMP
	213e
V.	Ed.
TOMBO BC/	72696
PROC.	16.45.07
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	23/05/07
BIB-ID	412038

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Z13e Zafalon Junior, Nivaldo
Estudo dos mecanismos envolvidos na taquiarritmia atrial
induzida por estimulação elétrica de alta frequência /
Nivaldo Zafalon Junior. --Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: José Wilson Magalhães Bassani, Rosana
Almada Bassani

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Arritmia. 2. Modelos biológicos. 3. Receptores de
substâncias endógenas. 4. Receptores musculares. 5.
Agentes cardiovasculares. 6. Bioengenharia. 7. Coração –
Ventrículos. I. Bassani, José Wilson Magalhães. II.
Bassani, Rosana Almada. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Study of mechanisms involved in atrial tachyarrhythmias induced
by high frequency electrical stimulation

Palavras-chave em Inglês: Atrial tachyarrhythmias, Biomedical engineering,
Cholinergic, Electrical stimulation, Animal model, Vectoatriogram,
Cellular receptor

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Eduardo Tavares Costa, Wilson Nadruz Junior, Dalmo Antonio
Ribeiro Moreira, Vera Lucia da Silveira Nantes Button e Antônio
Augusto Fasolo Quevedo

Data da defesa: 24/11/2006

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

TERMO DE RESPONSABILIDADE SOBRE A TESE

AUTOR: Zafalon Jr., Nivaldo.

ORIENTADORES: Bassani, José Wilson Magalhães & Bassani, Rosana Almada.

TÍTULO: Estudo dos mecanismos envolvidos na taquiarritmia atrial induzida por estimulação elétrica de alta frequência

GRADUAÇÃO: Doutorado.

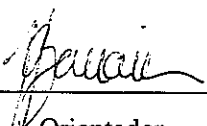
EDITORA: UNICAMP

ANO: 2006-11-17

Nós, responsáveis pela obra acima relacionada, AUTORIZAMOS a reprodução TOTAL da mesma a partir de 01/11/2008.

Obs: _____

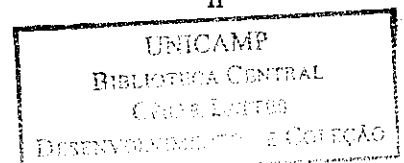

Orientador


Orientador


Autor

2007 22965

ii



*Dedico este trabalho aos meus
pais, irmãos e minha namorada
Carol.*

Agradecimentos

Enfim percebo que conclui mais um parágrafo de minha vida. Espero que meus amigos e mestres tenham orgulho desta conquista, e saibam que, sem a participação de absolutamente todos nada disto teria sido possível.

Aos orientadores, símbolos que permanecerão pelo resto de minha vida como modelos de seriedade, competência e dedicação, agradeço não somente pela orientação, mas principalmente, pelos ensinamentos que tão gentilmente souberam conceder.

Agradeço, também, aos Professores do Departamento de Engenharia Biomédica, aos técnicos e estagiários dos Laboratórios de Apoio à Pesquisa Básica e Apoio ao Desenvolvimento, especialmente ao Eng^o. *Sérgio Paulo Moura*, Sr. *Mauro Sérgio Martinazo* e Sras. *Ana Carolina Fantin* e *Elizângela S.O. Vieira*, pelo excelente apoio técnico.

Aos amigos *Aldo Mangili Jr.* e *Sandro Aparecido Ferraz* que sempre estiveram ao meu lado, mesmo nos momentos difíceis. Aos amigos *Beatriz M. Romano Carvalho*, *Hayram Nicacio*, *Pedro X. de Oliveira*, *Rafael A. Ricardo* e *Elicarlos Cayres* que, além de contribuições técnicas, com sua amizade, me deram forças espirituais indispensáveis.

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

ABREVIATURAS

AC	Adenilato-ciclase
ACh	Acetilcolina
AD	Átrio direito
ATP	Trifosfato de adenosina;
bpm	Batimentos por minuto
cAMP	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina
CCh	Carbacol
E_{Na}	Potencial de equilíbrio do Na^+
EPM	Erro padrão da média
GTP	Trifosfato de guanosina
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
$I_{Ca,L}$	Corrente de Ca^{2+} tipo L
I_K	Corrente retificadora retardada de K^+
I_{K1}	Corrente retificadora de entrada de K^+
$I_{K(ACh)}$	Corrente de K^+ dependente de ACh
$I_{K,ATP}$	Corrente de K^+ sensível a ATP
I_{Na}	Corrente de Na^+
ISO	Isoproterenol
IT	Índice de taquiarritmia
I_{to}	Corrente transitória de saída de K^+
K-H	Solução de Krebs-Henseleit
LE	Limiar estimulatório atrial
LI	Limiar de indução de taquiarritmia atrial
N	Número de amostras
PA	Potencial de ação
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Quinase de proteína dependente de cAMP
PKG	Quinase de proteína dependente de cGMP
PP	Fosfatase
sGC	Guanilato-ciclase solúvel
TA	Taquiarritmia atrial
VEM	Vetor elétrico médio
V_m	Potencial de membrana

RESUMO

Taquiarritmias atriais (TA) são o tipo de arritmia crônica mais comum, e mostram associação com risco de acidentes tromboembólicos. Os mecanismos envolvidos neste tipo de arritmia têm sido alvo de numerosos estudos. Nossa equipe desenvolveu um modelo de geração de TA de origem colinérgica em átrios isolados por estimulação elétrica de alta frequência, cuja caracterização foi o objeto do presente estudo. Neste trabalho, desenvolvemos, implementamos e validamos uma metodologia para o estudo dos padrões de propagação da atividade elétrica durante arritmias, que se baseia na determinação do vetotriograma. Nossos principais resultados foram:

- a) O padrão de propagação da atividade elétrica durante TA de origem colinérgica em átrios direitos é consistente com o desenvolvimento de reentrância da propagação, enquanto que, durante arritmia de origem β -adrenérgica em átrio esquerdo (por sobrecarga celular de Ca^{2+}), o padrão é semelhante ao observado em átrios direitos sob ritmo sinusal, portanto compatível com a formação de focos ectópicos.
- b) Como observado em estudos anteriores, há um antagonismo entre as vias de sinalização colinérgica muscarínica e β -adrenérgica na determinação da susceptibilidade do tecido a TA. Neste trabalho, constatamos que o efeito pró-arritmico da ativação da primeira via em condições de estimulação β -adrenérgica é suprimido por inibição de fosfatases de proteínas. Isto nos permite concluir que a ativação de fosfatases pela via muscarínica parece ser um mecanismo adicional envolvido neste antagonismo.
- c) Dado que resultados prévios na literatura indicam que a redução na duração do potencial de ação atrial, por aumento da condutância de fundo da membrana ao K^+ , tem importante papel no favorecimento de reentrância por agonistas muscarínicos, levantamos a hipótese de que este mecanismo seja suficiente para facilitar a indução de TA. Para testá-la, investigamos o efeito do pinacidil, que promove a abertura de canais de K^+ dependentes de ATP. A aplicação deste fármaco facilitou consideravelmente a indução de TA, de modo dependente de concentração e independente de estimulação de receptores muscarínicos. Além disso, o padrão de propagação da atividade elétrica atrial foi essencialmente semelhante àquele observado durante TA de origem colinérgica e compatível com o desenvolvimento de circuitos reentrantes. Estes resultados não só representam suporte para nossa hipótese, mas também são sugestivos de que condições como hipóxia e isquemia, que podem resultar em depleção do ATP citosólico e abertura dos canais de K^+ dependentes de ATP, aumentem a vulnerabilidade atrial ao desenvolvimento de circuitos reentrantes e TA.

ABSTRACT

Atrial tachyarrhythmias (TA), the most common type of chronic arrhythmia, are associated with increased risk of thromboembolic accidents. Several investigators have attempted to gain insight into the mechanisms underlying TA. Our research team has developed an *in vitro* model of TA induction by high frequency electric stimulation of isolated atria, which is dependent on muscarinic cholinergic receptor stimulation (cholinergic TA). Aiming at further characterization of this model in the present study, we developed, implemented and validated a method to analyze the pattern of propagation of electric activity during arrhythmias, based on the determination of the vectoatriogram. Our main results were:

- a) The pattern of electric propagation during cholinergic TA is in agreement with that expected for reentrant propagation. On the other hand, the pattern observed during arrhythmia evoked by β -adrenoceptor stimulation in left atria (cell Ca^{2+} overload) resembles that seen in right atria during spontaneous sinus rhythm, and is thus compatible with the appearance of ectopic automatic foci.
- b) As previously observed, muscarinic cholinergic and β -adrenergic signaling pathways interact antagonistically to determine atrial susceptibility to arrhythmia induction. In this study, we found that protein phosphatase inhibition suppressed the cholinergic pro-arrhythmic effect in the presence of β -adrenergic stimulation. We thus conclude that muscarinic-dependent protein phosphatase activation seems to be an additional mechanism involved in the functional antagonism of these signaling pathways.
- c) Based on previous results from other laboratories showing that atrial action potential abbreviation, due to increase in membrane background K^+ conductance, is of paramount importance for reentry facilitation by muscarinic agonists, we hypothesized that this electrophysiological change would be sufficient for facilitation of TA induction. The hypothesis was investigated by testing the effects of pinacidil, an ATP-dependent K^+ channel opener. Pinacidil caused a marked, concentration-dependent increase in TA induction, which was independent of muscarinic cholinergic receptor stimulation. In addition, the electric propagation pattern during TA was similar to that observed during cholinergic TA, which is suggestive of establishment of reentrant circuits. These results not only support our hypothesis, but also point out that conditions that may cause depletion of cytosolic ATP, such as hypoxia and ischemia, may increase atrial vulnerability to the occurrence of electric reentry and tachyarrhythmia.

SUMÁRIO

1	Introdução	01
1.1	Conceitos de eletrofisiologia	02
1.2	Atividade elétrica do coração	05
1.3	Taquiarritmias atriais	12
2	Objetivos	20
3	Material e Métodos	22
3.1	Animais	23
3.2	Preparação biológica	23
3.3	Montagens experimentais	23
3.4	Protocolo experimental de montagem dos átrios	28
3.5	Indução de taquiarritmia atrial por estimulação elétrica	28
3.6	Influência de fármacos sobre a indução de taquiarritmia	31
3.7	Vetoatriograma	31
3.8	Estudo do efeito da abertura de canais de K^+ operados por ATP sobre a indução de TA	38
3.9	Estudo da participação de fosfatases no antagonismo adrenérgico-colinérgico na indução de TA	40
3.10	Soluções	40
3.11	Análise estatística	41
4	Resultados	42
4.1	O eletrograma bidimensional	43
4.2	Taquiarritmia induzida por abertura de canais de K^+ regulados por ATP	48

4.3	Envolvimento de fosfatases na facilitação colinérgica de arritmia induzida por estimulação elétrica em átrio direito de rato	55
5	Discussão e Conclusões	59
5.1	Vetoatriograma e arritmias atriais	60
5.2	Efeito pró-arrítmico da abertura de canais de K ⁺ dependentes de ATP	64
5.3	Papel de fosfatases no antagonismo adrenérgico-colinérgico na indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência	67
5.4	Proposta de mecanismos relevantes na determinação da susceptibilidade atrial a taquiarritmia por estimulação elétrica de alta frequência	69
6	Referências Bibliográficas	72

Capítulo 1

Introdução

1.1 CONCEITOS DE ELETROFISIOLOGIA

1.1.1 O Potencial de Ação

O potencial de ação (PA) é uma variação transitória do potencial de membrana (V_m) que se observa em células excitáveis (e.g., neurônios e miócitos) quando um estímulo despolarizante é capaz de desencadear fluxo de corrente transmembrana de magnitude suficientemente alta. Quando a magnitude do estímulo é baixa, a resposta elétrica da membrana guarda relação linear com a amplitude do estímulo e se dissipa no espaço e no tempo, de acordo com as propriedades resistivas e capacitivas da membrana (David, 1990; Weiss, 1997). O PA, ao contrário, é propagado sem perda de suas características (curso temporal e amplitude), e decorre da abertura aproximadamente síncrona de canais dependentes de voltagem que medeiam a rápida difusão de íons através da membrana (Okuno, 1982). Dependendo da expressão e função de diferentes tipos de canais iônicos, o PA pode ter diferentes formas de onda em diferentes tipos de células excitáveis.

A **Figura 1.1a** ilustra o curso temporal de um PA ventricular. A **Figura 1.1b** mostra o curso temporal das correntes de Na^+ (I_{Na}) e de Ca^{2+} do tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) durante o PA, e a **Figura 1.1c** apresenta o curso temporal das 3 principais correntes de K^+ no coração: transiente de saída (*transient outward*, I_{to}), retificadora retardada (*delayed rectifier*, I_{K}) e retificadora de entrada (*inwardly rectifying*, I_{K1}).

Para que um PA seja elicitado, a membrana deve sofrer uma despolarização para um valor crítico de potencial (potencial limiar), que é cerca de -60 mV em miócitos cardíacos. Neste valor de V_m , ocorre um aumento considerável e rápido da condutância ao Na^+ . Como o gradiente eletroquímico do Na^+ (diferença entre o potencial de equilíbrio do Na^+ , E_{Na} , e o V_m) é grande durante o repouso (120 - 150 mV), devido à grande diferença de concentração transmembrana deste íon (um fator de ~ 12 - 16), e a densidade de canais de Na^+ dependentes da voltagem é grande, a abertura destes canais permite o fluxo de uma corrente de alta magnitude (influxo de Na^+ , **Figura 1.1b**), e V_m tende a E_{Na} (**Figura 1.1a**, fase 0 do PA). Com o tempo, a amplitude de I_{Na} se reduz, devido à queda do gradiente eletroquímico do íon e à inativação dos canais, que é dependente de tempo e potencial. A rápida despolarização da membrana causada pela I_{Na} leva à abertura de outros canais, que são ativados a potenciais menos negativos e de modo mais lento do que aqueles de Na^+ , como, por exemplo, canais de K^+ , o que dá origem a correntes repolarizantes de saída de K^+ (**Figura 1.1c**). Estas correntes repolarizantes, associadas à

redução de I_{Na} , contribuem para o fim do processo de despolarização e início do processo de repolarização.

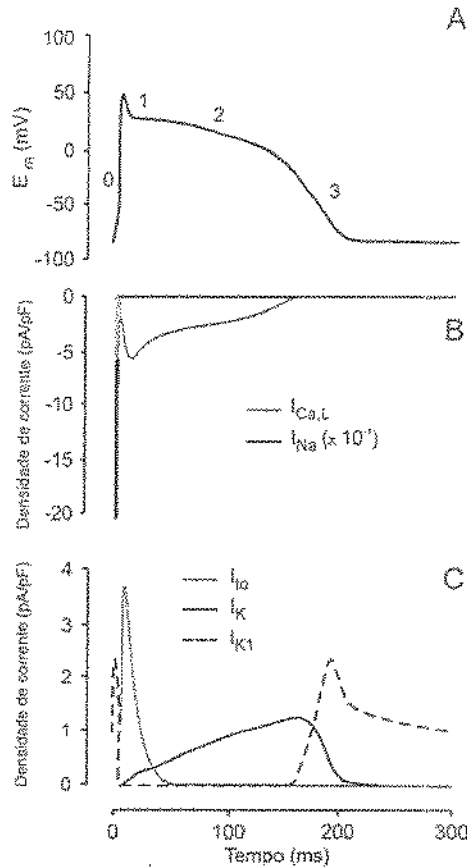


Figura 1.1 – A) Curso temporal do potencial de ação (PA) ventricular de coelho. Os números representam as fases do PA. Na fase 0, a membrana sofre uma brusca despolarização devido à corrente de Na^+ (I_{Na}); na fase 1, ocorre repolarização parcial da membrana, devido à inativação de I_{Na} e à rápida ativação da corrente de K^+ transitória de saída (I_{K0}), que sofre rápida inativação a seguir; na fase 2, chamada de platô, a taxa de repolarização é baixa, devido ao balanço entre a corrente repolarizante de saída de K^+ (I_K), de ativação lenta, e a corrente despolarizante de Ca^{2+} (I_{Ca}); finalmente, na fase 3, como o aumento de amplitude das correntes repolarizantes de K^+ (I_K e I_{K1}) e inativação de I_{Ca} , o potencial de membrana volta ao seu valor de repouso; B) curso temporal das correntes de Ca^{2+} do tipo L ($I_{Ca,L}$) e I_{Na} durante o PA. Para facilitar a representação gráfica, I_{Na} é mostrada com uma amplitude dez vezes menor do que sua amplitude real. C) curso temporal das correntes de K^+ (I_{K0} , I_K e I_{K1}) durante o PA. Nesta figura, os componentes de I_K foram reunidos numa única corrente, e as correntes carregadas por transportadores iônicos (i.e. trocador Na^+-Ca^{2+} , ATPase Na^+-K^+), bem como as correntes de Cl^- foram omitidas. (Mod. de Bassani, 2006).

O efluxo de K^+ através de canais que se ativam e inativam rapidamente (I_{to}) promove repolarização parcial da membrana (Figura 1.1, fase 1 do PA). A seguir, ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} do tipo L, que têm uma resposta lenta à variação de potencial. A entrada de Ca^{2+} resulta no desenvolvimento de uma corrente despolarizante ($I_{Ca,L}$), a qual se contrapõe à lenta corrente de saída K^+ e contribui para reduzir marcadamente a taxa de repolarização, o que leva à ocorrência de um platô (Figura 1.1a, fase 2). O retorno de V_m para o valor de repouso (Figura 1.1a, fase 3) depende da inativação dos canais que medeiam correntes despolarizantes (especialmente $I_{Ca,L}$) e do lento aumento de condutância da membrana ao K^+ , que permite o efluxo do íon e a conseqüente repolarização da membrana para um valor próximo do potencial de equilíbrio do K^+ ($E_K \approx -80$ a -90 mV) (Opie, 1998). É importante observar que: a) a inativação dos canais de Na^+ os tornam indisponíveis para ativação; b) a recuperação de sua disponibilidade requer tempo e depende de V_m ; e c) as propriedades cinéticas dos canais de K^+ dependentes de voltagem fazem com que a condutância da membrana ao K^+ permaneça aumentada por dezenas ou até centenas de milésimos de segundo após o início de um PA, o que dificulta a despolarização da membrana. Como conseqüência destes fenômenos, é impossível o disparo de dois PAs sucessivos após um intervalo muito curto. O intervalo mínimo requerido para recuperação da excitabilidade da membrana para o nível de repouso denomina-se período refratário. Em geral, a duração do período refratário guarda estreita relação com a duração do PA (Katz, 1993).

1.1.2 A Condução do PA

No coração, o PA é o sinal que desencadeia o processo de contração. A atividade elétrica cardíaca tem origem no nódulo sinoatrial, onde as células possuem a capacidade de desenvolver PAs espontaneamente, e a partir daí ela se propaga ao longo de todo o coração.

Um PA percorrendo uma fibra miocárdica é propagado por correntes de circuitos locais. Essas correntes locais, que se formam na interface entre as regiões despolarizada e polarizada da membrana, tendem a despolarizar a região da membrana em repouso adjacente à interface. Como visto, os canais de Na^+ são ativados quando V_m atinge o valor limiar, de cerca de -60 mV. A corrente de entrada de Na^+ vai, então, despolarizar muito rapidamente a membrana neste ponto, de modo que esta região da membrana irá se tornar parte da zona despolarizada e a interface se deslocará (Berne & Levy, 1991), e assim por diante.

As membranas nas extremidades de miócitos vizinhos interdigitam-se formando regiões especializadas de contato chamadas discos intercalados. Nestes discos, as membranas das duas células ocasionalmente formam junções tipo *gap* (*nexus*). Nas membranas das células que formam a junção, há canais de alta condutância, formados por conexinas. Estes canais permitem comunicação dos compartimentos intracelulares das células adjacentes (cada célula contribui com um hemi-canal), e, deste modo, constituem uma via de baixa resistência para correntes que fluem de uma célula para outra, considerada importante na propagação intercelular da excitação elétrica (Sperelakis, 1991).

1.2 ATIVIDADE ELÉTRICA DO CORAÇÃO

1.2.1 A Condução da Atividade Elétrica no Coração

A atividade elétrica cardíaca tem início no nódulo sinoatrial. O PA ali desenvolvido propaga-se pelo miocárdio atrial, chegando até o nódulo atrioventricular. No nódulo átrio-ventricular, a propagação da atividade elétrica tem sua velocidade reduzida devido ao estreitamento das fibras musculares nodais e à menor densidade de discos intercalados que conectam estas fibras. Deixando o nódulo átrio-ventricular, a atividade elétrica é conduzida para o feixe de His, que se situa nas superfícies direita e esquerda do septo interventricular, onde a velocidade de condução é alta, e, em seguida, atinge as fibras de Purkinje e o miocárdio ventricular, onde é propagada entre miócitos através das junções *gap* ao longo da parede dos ventrículos (Guyton & Hall, 2002). A **Figura 1.2** ilustra as estruturas onde se dão a geração e condução da atividade elétrica.

1.2.2 O Eletrograma

Durante a condução da atividade elétrica, ocorre o deslocamento da frente de onda representada pela interface entre o tecido despolarizado e o tecido ainda polarizado. Esta frente de onda dá origem a um campo elétrico, cuja ocorrência permite a medição de diferenças de potencial elétrico entre pontos distintos do corpo (volume condutor). O eletrograma é o registro desta diferença de potencial (Rawlings, 1991).

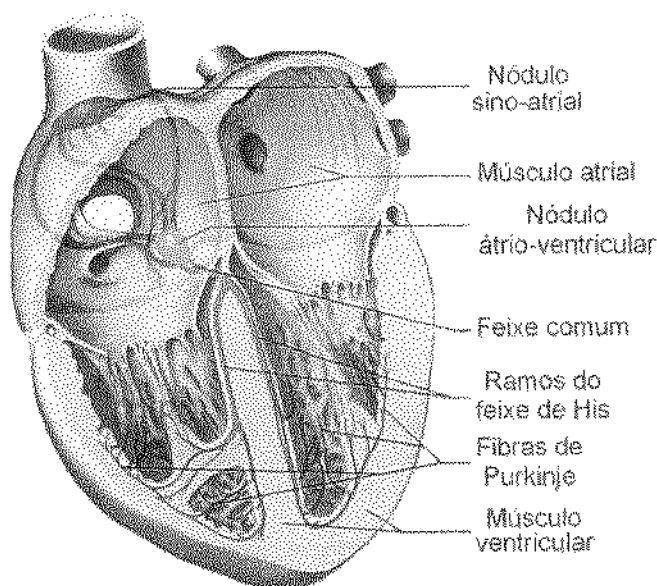


Figura 1.2 - Estruturas do coração envolvidas na geração e condução da atividade elétrica cardíaca (modificado de Netter, 1978).

A **Figura 1.3** mostra a representação de um pedaço de tecido eletricamente homogêneo (isotrópico) com uma forma geométrica simétrica, onde se propaga uma onda de despolarização a uma velocidade constante. Suponhamos que, em um determinado instante, a frente de onda assuma a forma mostrada na figura. Desse modo, a cada elemento diferencial da linha que se forma na interface das regiões polarizada e despolarizada do tecido, podemos associar um dipolo elétrico ($\delta \vec{E}$) de módulo constante, cuja orientação é perpendicular à linha em questão. A integral de linha destes vetores de campo elétrico ao longo de toda a interface define o vetor elétrico médio $\vec{E}$ (VEM), o qual está associado à direção média de propagação da atividade elétrica em um determinado instante, e cujo módulo e a orientação evoluem com a propagação da atividade elétrica.

Esta integração, ou de outro modo, este tratamento matemático, só é possível se o sistema em questão (o tecido no qual se propaga a atividade elétrica) obedece ao princípio da superposição, ou seja, se cada um dos dipolos elétricos não afeta as características (módulo e orientação) dos outros dipolos (Griffiths, 1999).

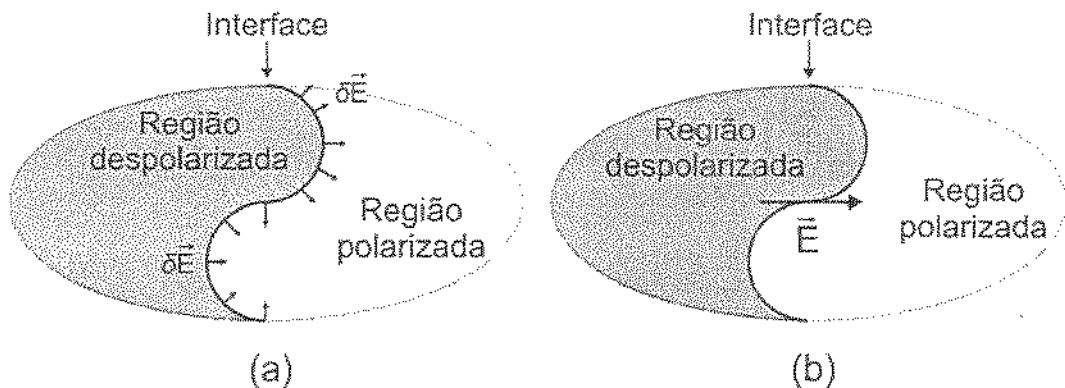


Figura 1.3 – Interface entre as regiões despolarizada e polarizada do tecido, estabelecida por uma frente de onda despolarizante. a) representação dos dipolos diferenciais de campo elétrico perpendiculares à tangente da linha definida pela interface ($\delta \vec{E}$); b) vetor elétrico médio ($\vec{E}$) resultante da integração dos dipolos elétricos diferenciais ao longo da interface.

A **Figura 1.4** apresenta a propagação da atividade elétrica num fragmento de tecido miocárdico. Na **Figura 1.4(a)**, mostra-se que o tecido encontra-se imerso em um volume condutor, no qual também estão imersos dois eletrodos de captação (V_A e V_B) e um eletrodo de referência V_R . Estes eletrodos estão conectados a um amplificador diferencial de ganho A . V_S é a tensão de saída do amplificador, cujo valor é dado pela equação mostrada na **Figura 1.4(l)**. No painel (a) da figura, o tecido encontra-se em repouso elétrico; portanto, VEM é nulo. A atividade elétrica tem início no lado esquerdo do tecido e se propaga da esquerda para a direita. Com o início da propagação da atividade elétrica, é estabelecido um VEM ($\vec{E}$), associado em módulo e sentido ao comprimento e orientação, respectivamente, da seta que atravessa a interface. Na **Figura 1.4(b)** a atividade elétrica encontra-se em sua fase inicial de propagação. Na **Figura 1.4(c)**, VEM assume seu valor máximo. Isto ocorre porque neste instante a linha definida pela interface entre o tecido despolarizado e polarizado apresenta o comprimento máximo (i.e, máxima área da interface), e como havíamos considerado no parágrafo anterior, VEM é dado pela integral de linha formada na interface entre o tecido despolarizado e ainda polarizado.

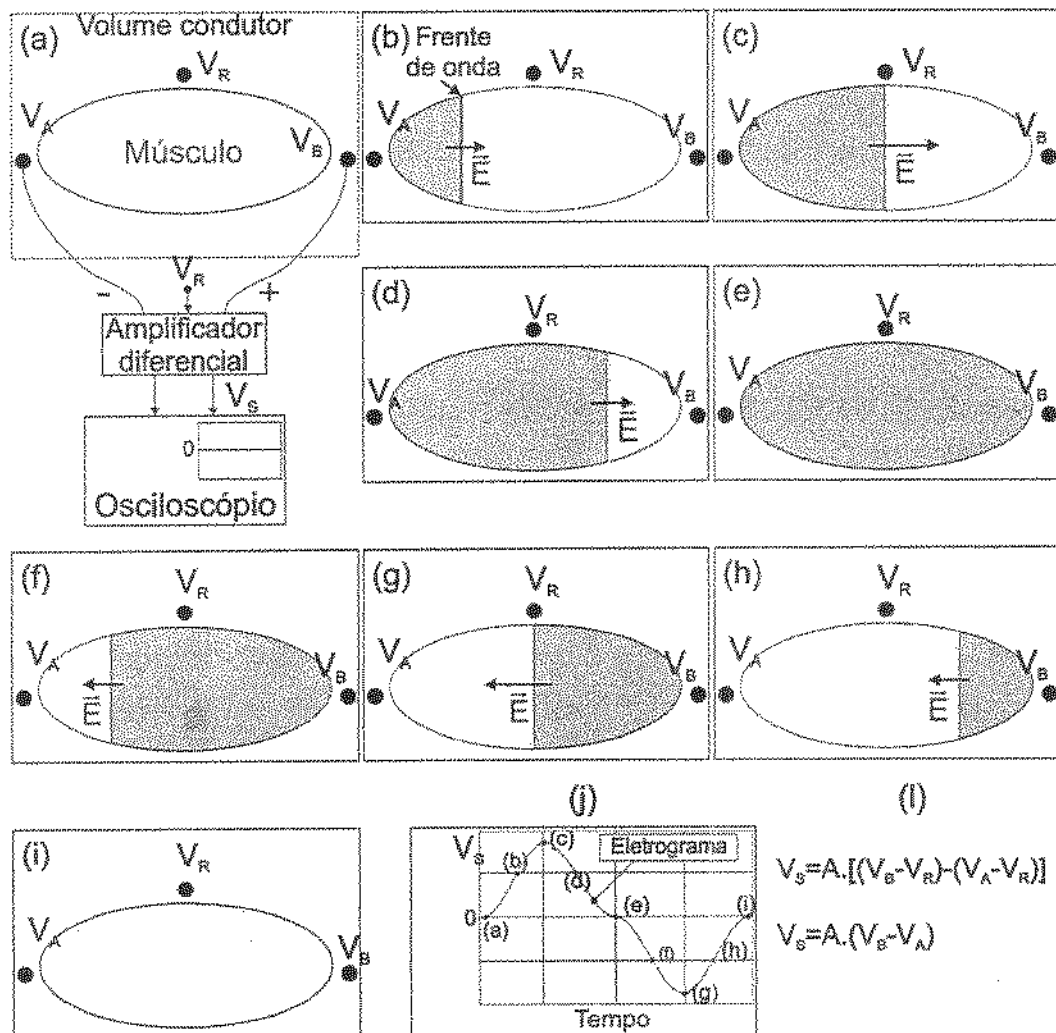


Figura 1.4 – Obtenção de um eletrograma: (a) disposição dos eletrodos de captação; deve-se observar que toda a massa muscular encontra-se em repouso elétrico (todas as células estão igualmente polarizadas), portanto, V_S é zero; (b) após a geração do impulso elétrico, a onda de despolarização inicia sua propagação, e temos o estabelecimento de um dipolo na massa muscular; neste instante $V_A < 0$, $V_B > 0$ e $V_S > 0$; (c) instante de máximo V_S , quando $V_A = -V_B$, e $V_B > 0$; (d) neste momento, temos $|V_A| > V_B$ e $V_B > 0$; (e) neste instante, a massa muscular está homogeneamente despolarizada (não há dipolo), portanto $V_A = V_B$, conseqüentemente $V_S = 0$. A partir de agora temos o desenvolvimento do processo de repolarização, no qual VEM tem sua orientação invertida. (f) após o início do processo de repolarização, tem-se $V_A > 0$, $V_B < 0$ e $V_S < 0$; (g) instante de máximo V_S com polaridade invertida, quando $V_A = -V_B$ com $V_A > 0$; (h) neste instante, temos $|V_B| < V_A$ e $V_A > 0$; (i) com o término do processo de repolarização, volta-se à condição inicial, na qual $V_S = 0$; (j) eletrograma registrado ($V \times t$); e (l) modelo matemático para obtenção de V_S .

No instante que o tecido está completamente despolarizado, mas o processo de repolarização ainda não se iniciou, VEM é nulo (**Figura 1.4(e)**). Durante o processo de repolarização, a frente de onda de repolarização tem o mesmo padrão de propagação que a de despolarização. Assim, nas **Figuras 1.4(f), (g) e (h)**, a evolução de VEM tem as mesmas características que observamos nas figuras anteriores, diferindo apenas no sentido de VEM. Na **Figura 1.4(i)**, a repolarização se completou, o tecido voltou ao repouso elétrico e VEM voltou a ser nulo. A **Figura 1.4(j)** mostra o registro gráfico da diferença de potencial medida entre os eletrodos de captação multiplicados pelo ganho do amplificador (V_S), nos instantes indicados de (a) a (i). Este registro é o eletrograma.

1.2.3 O Eletrocardiograma

O eletrocardiograma nada mais é do que um eletrograma da atividade cardíaca no qual o potencial é, na maioria das vezes, registrado na superfície do corpo em posições padronizadas (Rawlings, 1991).

A **Figura 1.5** apresenta três das principais disposições de eletrodos utilizadas na eletrocardiografia. Nos painéis (a), (b) e (c) desta figura, é mostrada a maneira como os eletrodos são colocados no corpo para registros das derivações clássicas I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente). A **Figura 1.5(d)** apresenta a maneira pela qual os registros das derivações são tratados no aspecto vetorial, segundo o conceito do triângulo de Einthoven, no qual as diferenças de potenciais captados nos eletrodos representam componentes do VEM em um sistema de coordenadas não ortogonais. Neste sistema de coordenadas, os vetores da base formam um triângulo equilátero.

1.2.4 O Vetocardiograma

O vetocardiograma é um diagrama que descreve as variações de módulo e direção do VEM ao longo de um ciclo cardíaco. A **Figura 1.6** descreve a obtenção do vetocardiograma ventricular. As setas representam o dipolo (vetor) elétrico médio em instantes diferentes do ciclo cardíaco. Os triângulos representam os eixos de captação do eletrocardiograma planar nas derivações clássicas D1, D2 e D3, com base no triângulo de Einthoven. As projeções do VEM em cada um dos eixos e os respectivos traçados desenvolvidos ao longo do tempo também estão indicados, bem como a trajetória do VEM.

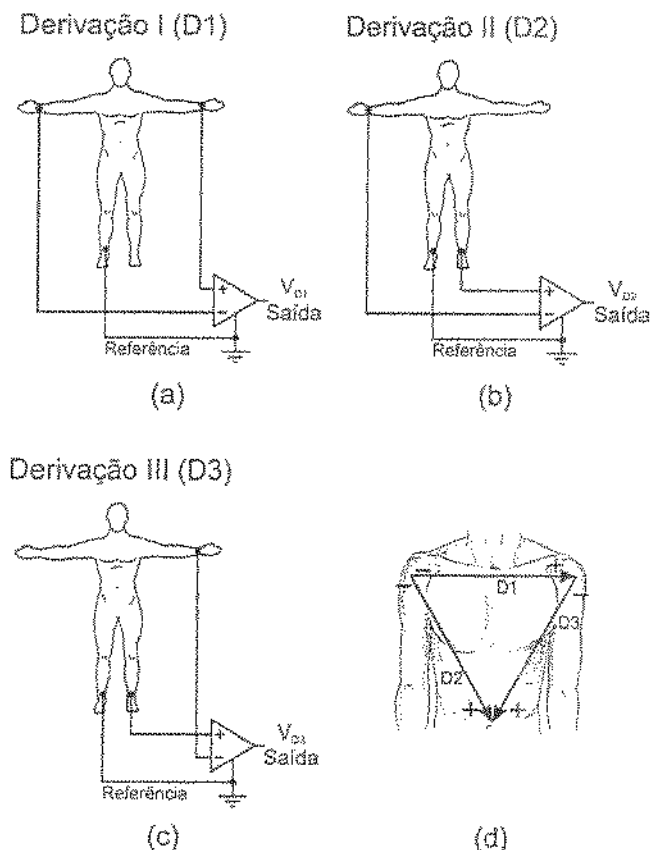


Figura 1.5 – (a), (b) e (c): esquema da disposição dos eletrodos para medição do eletrocardiograma na derivação clássicas I (D1), II (D2) e III (D3), respectivamente; d) representação do triângulo de Einthoven (modificado de Rawlings, 1991).

Para a obtenção do vetocardiograma, pode-se utilizar qualquer combinação de duas das derivações D1, D2 e D3. Estas derivações definem as direções dos componentes do VEM que, a todo instante, podem ser interpretados como vetores. Como os componentes do VEM são as suas projeções no eixo de cada derivação, a medição do vetor consiste em obter os módulos dos componentes (que correspondem ao sinal elétrico medido em cada derivação) e, com estes valores, encontrar o módulo e direção do VEM. Veja na **Figura 1.6(a)** que o VEM pode ser determinado geometricamente pela definição dos seus pontos inicial e final como sendo os cruzamentos das perpendiculares a partir da base e ponta de cada um dos vetores componentes. O registro da posição da ponta do vetor elétrico médio ao longo do tempo constitui o chamado vetocardiograma.

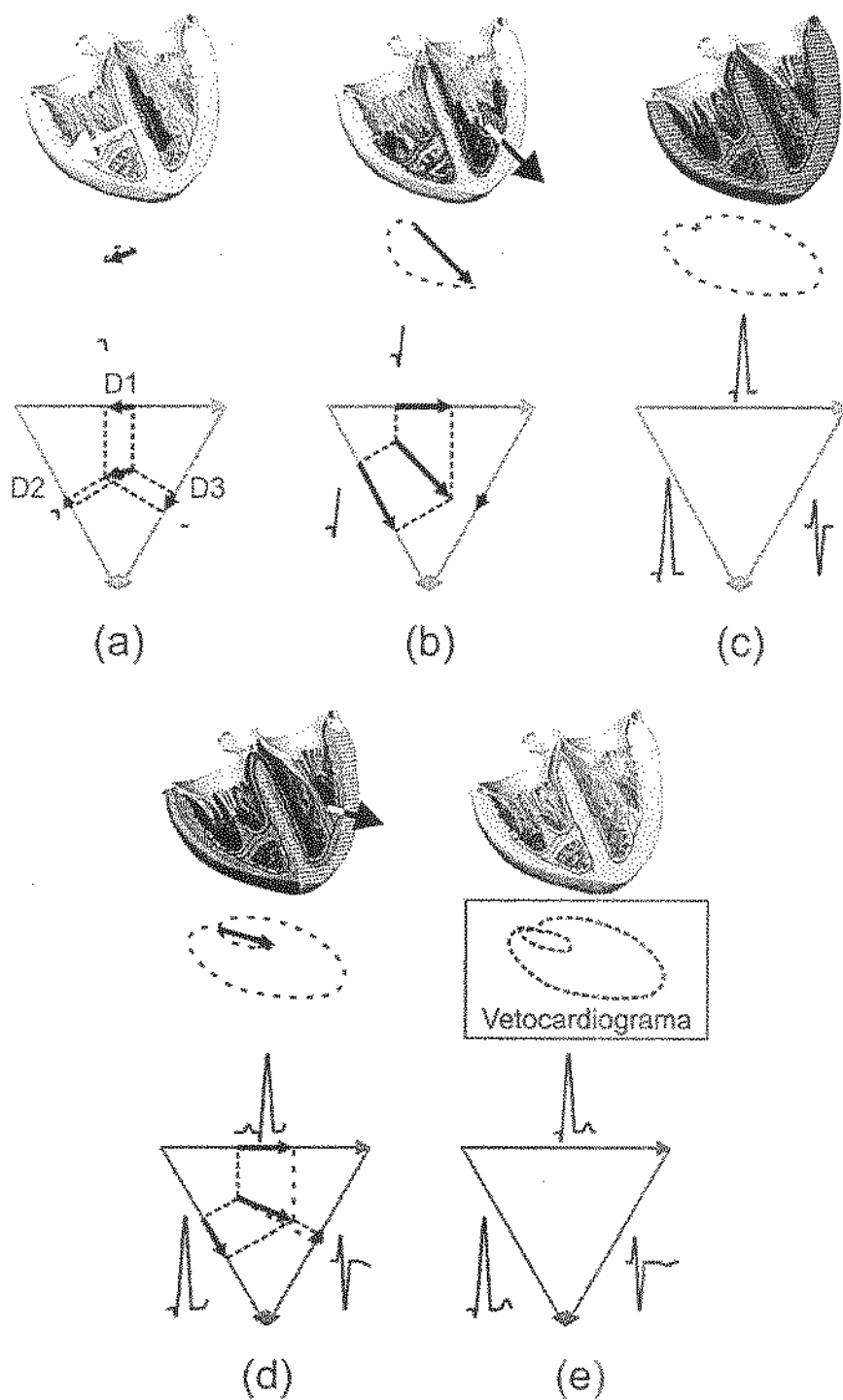


Figura 1.6 - Vetocardiograma ventricular durante o ciclo cardíaco (modificado de Netter, 1978). Veja texto para detalhes.

Neste trabalho, aplicamos a metodologia para a obtenção do vetocardiograma a preparações atriais *in vitro* durante o ritmo sinusal, e durante a ocorrência de taquiarritmias atriais induzidas por estimulação elétrica de alta frequência e por agentes farmacológicos.

Um ponto relevante para o presente trabalho é que, quando o processo de despolarização ou repolarização se completa, VEM é nulo, ou seja, não há propagação de atividade elétrica no tecido nesse instante. Isto ocorre durante o ritmo sinusal, quando a atividade gerada pelo nódulo sinoatrial é propagada ao longo do tecido e se extingue após a repolarização completa do tecido (i.e., a cada ciclo, os miócitos atriais e ventriculares são ativados uma única vez).

1.3 TAQUIARRITMIAS ATRIAIS

As arritmias atriais são alterações do ritmo de atividade elétrica causadas por distúrbios de geração e/ou condução da atividade elétrica atrial. As taquiarritmias atriais (TA) compreendem as arritmias caracterizadas por um aumento na frequência de ativação elétrica dos átrios.

Embora as TAs não tenham o mesmo grau de letalidade imediata que as arritmias ventriculares, elas frequentemente estão associadas ao desenvolvimento de outras complicações que prejudicam a qualidade de vida, podendo até mesmo levar o indivíduo a óbito. As TAs podem comprometer a função bombeadora dos átrios. Durante a ocorrência de TA, o sangue pode permanecer um tempo excessivamente longo nos átrios, o que facilita a formação de coágulos que, ao serem ejetados para a circulação, podem obstruir pequenos vasos sanguíneos e causar tromboembolismo pulmonar ou sistêmico, ou ainda a obstrução coronariana (Lin *et al*, 1996; Seidl *et al*, 1998; Minamino *et al*, 1999). Segundo Prystowsky *et al*. (1996), 25% das vítimas de acidentes vasculares cerebrais apresentaram episódios prévios de TA. A Figura 1.7 apresenta a prevalência de TA em humanos de diferentes faixas etárias. A prevalência dobra a cada avanço de 10 anos na idade após os 50 anos, sendo 0,5% para idades entre 50 e 59 anos e chegando a 9% para idades entre 80 e 89 anos. Com maior incidência em homens do que em mulheres, TA é considerada a forma mais comum de arritmia cardíaca crônica (Kannel *et al*, 1998; Seidl *et al*, 1998). Levando-se em conta a previsão de aumento considerável da

proporção de idosos na população mundial, torna-se clara a importância do estudo dos mecanismos que facilitam a geração e manutenção das TAs.

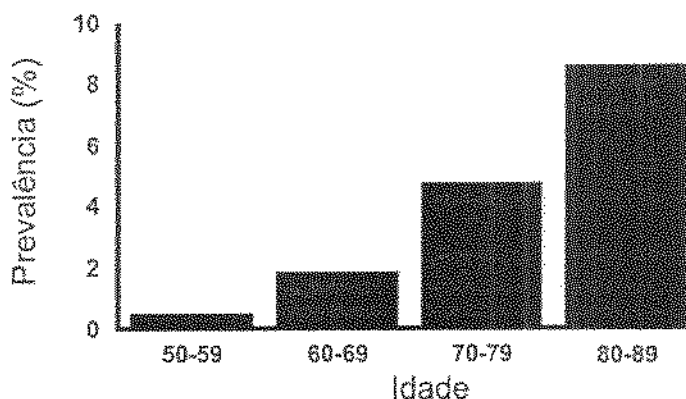


Figura 1.7 – Prevalência de taquiarritmias atriais (TA) em humanos, como função da idade (modificado de Kannel *et al.*, 1998).

Entre os distúrbios de geração da atividade elétrica que podem resultar em TA, inclui-se a ocorrência de focos ectópicos de automatismo (Hoffman & Rosen, 1981). Os focos ectópicos são células miocárdicas ou células de marca-passos subsidiários, que, em condições normais, são tipicamente quiescentes e acompanham o ritmo sinusal, mas, em certas circunstâncias, passam a desenvolver PAs espontaneamente e representar marca-passos adicionais ao nódulo sinoatrial. Os distúrbios de geração podem ainda envolver problemas no próprio marca-passo natural (nódulo sinoatrial) (Yusuf & Camm, 2005).

Os distúrbios de condução estão associados a uma mudança no padrão natural de ativação dos átrios. Esta alteração pode se expressar num padrão coordenado (*flutter*) ou num padrão desorganizado (fibrilação) de ativação elétrica. Em ambos os casos, ocorre auto-regeneração da atividade elétrica, que pode estar associada à formação de circuitos reentrantes (Waldo, 2002).

Para que um circuito reentrante se sustente, uma condição é essencial: que a frente de onda de despolarização encontre à sua frente tecido em condições de ser novamente excitado. Esta condição é satisfeita quando o tempo para que o circuito reentrante percorra toda sua trajetória é maior que o período refratário. Assim, a manutenção de circuitos reentrantes pode ser facilitada por redução tanto da duração do período refratário, quanto da velocidade de condução da atividade elétrica. O

estabelecimento de circuitos reentrantes pode ainda ser facilitado pela existência de barreiras anatômicas (e.g., tecido fibroso) e/ou funcionais (regiões onde o acoplamento elétrico entre miócitos é reduzido) para a condução. Deste modo, o estabelecimento de um circuito reentrante depende da existência de um substrato anatômico e/ou funcional, caracterizado por diferenças na velocidade de condução e/ou duração do período refratário, ou seja, ocorrência de anisotropia elétrica e dispersão de refratariedade, respectivamente (Allessie *et al.* 2001; Jalife *et al.*, 2002; Waldo, 2002).

A **Figura 1.8** apresenta um exemplo de como pode surgir um circuito reentrante. Na **Figura 1.8(a)**, é mostrado como a atividade elétrica se propaga ao redor de um obstáculo (e.g., um vaso sangüíneo). Na **Figura 1.8(b)**, é indicada uma região no ramo esquerdo onde ocorre bloqueio unidirecional da condução, de modo que a onda se propaga apenas pelo ramo da direita. A **Figura 1.8(c)** apresenta o passo seguinte, no qual a onda de atividade elétrica propagada pelo ramo da direita circunda o obstáculo e é conduzida retrogradamente, excitando a região do bloqueio do ramo da esquerda. Na **Figura 1.8(d)** temos o estabelecimento de um circuito reentrante, pois a onda propagada retrogradamente encontra tecido novamente excitável no ramo esquerdo. Assim, um único impulso gerado pelo nódulo sinoatrial pode levar a vários ciclos de propagação auto-perpetuada no circuito reentrante, em geral a uma alta frequência, pois o tempo de propagação reentrante costuma ser menor do que o intervalo natural do marca-passo sinoatrial (Hoffman & Rosen, 1981).

O presente trabalho trata do estudo de TA de origem colinérgica induzida por estimulação elétrica de alta frequência em átrio direito isolado de rato, modelo experimental descrito pela primeira vez por Godoy *et al.* (1999), e posteriormente utilizado nos estudos de Zafalon (2001) e Zafalon *et al.* (2004). Segundo Godoy *et al.* (1999), a indução deste tipo de TA requer tanto a estimulação elétrica a alta frequência (> 20 Hz), quanto a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos. Isto sugere que a estimulação elétrica promova a liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) das terminações para-simpáticas pós-ganglionares presentes no átrio isolado (Hirose *et al.*, 1997), e que a TA seja induzida pela ação do neurotransmissor liberado sobre o tecido atrial. Neste modelo, a indução de TA foi reprodutível por até 6 h, em experimentos nos quais se procedeu a até 60 tentativas de indução num mesmo átrio (Godoy *et al.*, 1999). Isto indica que o estoque de ACh neuronal não parece ser um fator limitante para indução repetida deste tipo de TA em átrios direitos.

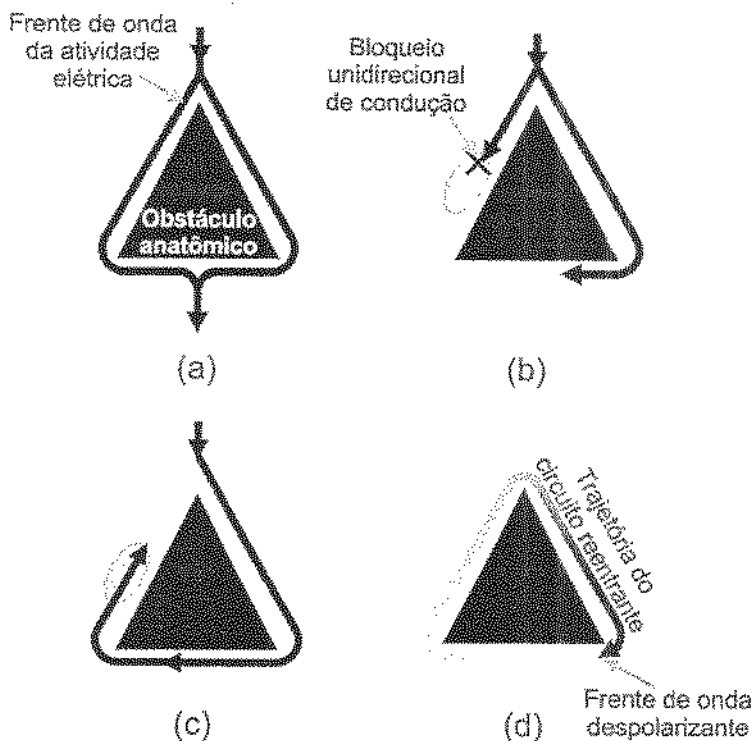


Figura 1.8 – Esquema que exemplifica um mecanismo para o desenvolvimento de um circuito reentrante com obstáculo anatômico. Veja texto para detalhes (modificado de Hoffman & Rosen, 1981).

A ocupação dos receptores colinérgicos muscarínicos na membrana celular dos miócitos atriais ativa uma cascata bioquímica que, além de reduzir a frequência espontânea das células marca-passo sinoatriais, altera as propriedades elétricas da membrana de miócitos. Entre estas alterações, destacam-se a redução da duração do PA e conseqüente abreviação do período refratário (Hoffman & Suckling, 1953; Boucher *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Sosunov *et al.*, 2002) e a redução na velocidade de condução do PA (Marques, 1989). Além disso, considerando-se o fato de que as terminações para-simpáticas não se encontram uniformemente distribuídas nos átrios (Hoover *et al.*, 2004), devemos observar que estas alterações ocorrem de maneira não homogênea no tecido, levando a aumento da anisotropia e da dispersão de refratariedade. Estes fatores, como já comentado, compõem um substrato que favorece o estabelecimento de circuitos reentrantes. Porém, como observado por Godoy *et al.* (1999), apenas a estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos não é condição suficiente para o desenvolvimento da TA, pois esta não ocorre na ausência de

estimulação elétrica, mesmo durante incubação do átrio com concentrações micromolares de ACh. Aparentemente, o aumento de anisotropia e/ou dispersão de refratariedade causado pela ativação da via muscarínica provê o substrato para o disparo de TA pela estimulação elétrica (que atuaria como um gatilho, Moreira, 2002), enquanto que a manutenção de TA no tecido seria possivelmente permitida pela re-excitação via circuitos reentrantes. A existência desses circuitos já foi demonstrada durante TA evocada pela aplicação de ACh em miocárdio atrial e ventricular (Allessie et al., 1984; Vaidya et. al. 1999; Banville et al., 1999). A **Figura 1.9** resume este mecanismo proposto para a indução de TA neste modelo experimental.

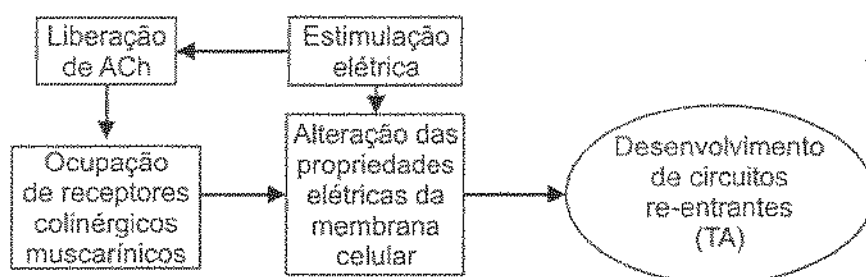


Figura 1.9 – Mecanismos prováveis envolvidos na indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência em tecido atrial isolado.

É importante ressaltar a importância clínica de TA de origem colinérgica, dada a existência de TA de origem neurogênica em indivíduos jovens sem sinais de doença cardiovascular, com ocorrência predominantemente noturna, que é precedida e sucedida por aumento e redução, respectivamente, do tônus vagal (Tomita et al., 2003).

A inervação regulatória autonômica do coração consiste, além de terminações colinérgicas, de terminações simpáticas, cujos neurotransmissores (catecolaminas) atuam sobre receptores adrenérgicos, especialmente receptores do tipo β , presentes na membrana das células miocárdicas, produzindo efeitos cronotrópico e inotrópico positivos. Em tese, a estimulação elétrica também poderia causar liberação de neurotransmissor simpático, que poderia estar envolvido na geração de TA. Godoy et al., (1999), no entanto, demonstraram que o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos por propranolol não afeta a indução de TA (Godoy, 1999). Porém, a estimulação destes receptores pela exposição de átrios direitos de rato ao agonista β -adrenérgico isoproterenol (ISO) reduz a ocorrência de TA (Zafalon, 2001; Zafalon et al., 2001, 2004), ou seja, a estimulação β -

adrenérgica antagoniza o efeito facilitatório da estimulação colinérgica muscarínica sobre a indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência. É possível que este antagonismo se baseie no efeito do ISO em reverter o encurtamento do PA produzido por ACh em miócitos atriais (Sosunov *et al.*, 2002), e é provavelmente relevante *in vivo*, pois foi demonstrado que catecolaminas endógenas, liberadas de terminações simpáticas atriais, são efetivas em inibir TA de origem colinérgica (Zafalon *et al.*, 2004).

Um importante mecanismo envolvido no antagonismo funcional entre as vias β -adrenérgica e colinérgica muscarínica consiste nos efeitos opostos destas duas vias sobre o controle da concentração intracelular do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O cAMP é sintetizado pela enzima adenilato-ciclase (AC). A ocupação de adrenoceptores β por agonistas tem um efeito estimulatório sobre a atividade da AC, mediado pela subunidade catalítica α_s da proteína G que interage com este tipo de receptor. A subunidade α_s dissocia-se das subunidades $\beta\gamma$ após hidrólise da molécula de trifosfato de guanósina (GTP), ligada à proteína G como consequência da ocupação do adrenoceptor β . Por outro lado, receptores colinérgicos muscarínicos do tipo m_2 associam-se a outra isoforma de proteína G, caracterizada por possuir uma subunidade α_i , que tem influência inibitória sobre a atividade da AC. Deste modo, a estimulação de adrenoceptores β e colinérgicos muscarínicos m_2 têm como efeitos o aumento e a redução, respectivamente, da taxa de síntese de cAMP (Opie, 1998).

A degradação do cAMP é feita pelas fosfodiesterases. Propõe-se que a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos tenha efeito estimulatório indireto sobre a atividade da isoforma II das fosfodiesterases (PDE II). Este efeito estimulatório envolve a ativação da enzima NO-sintase, que catalisa a produção de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina. O NO estimula a atividade da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que converte GTP em monofosfato cíclico de guanósina (cGMP). Este nucleotídeo, de modo análogo ao cAMP, também atua como segundo mensageiro intracelular, e medeia a estimulação da PDE II. Assim, a estimulação muscarínica pode reduzir a concentração intracelular de cAMP também por aumentar sua taxa de degradação (Brodde & Michel, 1999; Endoh 1999).

O efector intracelular da via β -adrenérgica é a quinase de proteínas dependente de cAMP (PKA). O cAMP promove a ativação da proteína quinase A (PKA) por sua ligação à unidade regulatória da enzima, o que resulta no desacoplamento e ativação de sua subunidade catalítica. Quando em estado ativo, a PKA fosforila diversos substratos, entre os quais canais de Ca^{2+} do tipo L, presentes no sarcolema. A fosforilação destes canais

aumenta sua probabilidade de abertura (Bers, 1991), o que poderia prolongar a fase de platô do PA e, portanto, o período refratário.

O controle da concentração intracelular de cAMP parece estar envolvido no antagonismo entre essas vias quanto à facilitação de indução de TA, pois o tratamento com isobutilmetilxantina (IBMX), um bloqueador não seletivo de PDE que aumenta a concentração intracelular de cAMP (Bethke *et al.*, 1992), reduziu a indução de TA em átrios direitos de modo semelhante ao tratamento com ISO (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2004). No entanto, mesmo na presença de ISO ou IBMX, que causam aumento da concentração citosólica de cAMP e redução da indução de TA, a aplicação de agonista colinérgico muscarínico exógeno, como o carbacol (CCh), é capaz de restaurar a ocorrência de TA para os níveis controle (i.e., aquela observada na ausência de ISO e IBMX) (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2004). Isto indica que a facilitação da indução de TA pela via muscarínica envolve outros mecanismos independentes da síntese e da degradação de cAMP em condições de estimulação β -adrenérgica.

O antagonismo funcional entre as vias β -adrenérgica e colinérgica muscarínica pode ocorrer não somente ao nível da concentração de cAMP, mas também ao nível da regulação do estado de fosforilação dos substratos da PKA, pois a ativação muscarínica no coração tem sido associada com a estimulação de fosfatases de proteínas, por meio de cGMP, cuja síntese é estimulada por ocupação de receptores colinérgicos muscarínicos (England, 1976; Herzig *et al.*, 1995; Brodde & Michel, 1999; Sakai *et al.*, 1999). Ou seja, além de reduzir a taxa de fosforilação de substratos intracelulares pela redução da síntese de cAMP (e, portanto, da estimulação da PKA), a estimulação muscarínica pode aumentar a taxa de desfosforilação desses substratos. Se este mecanismo é relevante no contexto da susceptibilidade a TA, ele deveria ser mais pronunciado na presença de alta atividade de PKA do que em condições basais. No presente estudo, investigamos também o possível envolvimento de fosfatases no antagonismo adrenérgico-colinérgico com respeito à TA induzida por estimulação elétrica.

O amiodarone, agente antiarrítmico amplamente utilizado na clínica médica (Ukani & Ezekowitz, 1995; Prystowsky *et al.*, 1996), é capaz de reverter o efeito facilitatório da estimulação muscarínica (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2004). Watanabe *et al.* (1996) relataram que amiodarone bloqueia a corrente de K^+ que flui através de canais ativados pela ocupação de receptores colinérgicos muscarínicos ($I_{K(ACh)}$). É interessante observar que estes autores encontraram que o bloqueio desta corrente pelo amiodarone foi associado à reversão do efeito da ACh em reduzir a duração do PA atrial. Portanto, esses

resultados podem implicar na participação de $I_{K(ACh)}$ no efeito facilitatório da estimulação muscarínica sobre a indução de TA (Zafalon *et al.*, 2004).

No presente estudo, testamos o efeito do pinacidil, um fármaco que promove a abertura de canais de K^+ regulados por ATP (Fan *et al.* 1990) sobre a indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência. Estes canais guardam grande semelhança estrutural e de propriedades biofísicas com aqueles ativados pela ocupação de receptores colinérgicos muscarínicos m_2 (Snyders, 1999). Com estes experimentos, queremos responder à seguinte pergunta: a abertura de canais de K^+ regulados por ATP mimetiza o efeito arritmogênico da estimulação muscarínica? Ou seja, nosso objetivo é investigar se o aumento mantido da condutância da membrana ao K^+ *per se* é necessário e suficiente para causar facilitação da geração e manutenção de TA.

Em suma, no presente trabalho, nos propusemos a prosseguir no estudo da indução de TA em átrios isolados por estimulação de alta frequência, estudo este iniciado no projeto de Mestrado. Pelo desenvolvimento e implementação de uma nova abordagem experimental (determinação do vetoatriograma), buscamos identificar o padrão de propagação da atividade elétrica neste tipo de TA. Nos propusemos ainda a investigar a importância do aumento da condutância de *background* da membrana ao K^+ na geração de TA, e a esclarecer melhor os mecanismos de antagonismo das vias colinérgica muscarínica e β -adrenérgica na determinação da susceptibilidade a este tipo de TA.

Capítulo 2

Objetivos

OBJETIVOS

- a) Desenvolver e implementar uma metodologia para o estudo dos padrões de propagação da atividade elétrica durante arritmias atriais;
- b) Testar a hipótese de que o aumento da condutância de fundo da membrana ao ion K^+ é necessária e suficiente para a facilitação da indução e manutenção de TA.

Capítulo 3

Material e Métodos

3.1 ANIMAIS

No presente trabalho, utilizou-se ratos Wistar adultos de ambos os sexos com idade entre 5 e 7 meses. Os animais foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos até o dia do experimento no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) /UNICAMP (registro no. CN034-05 no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas coletivas (3 animais por gaiola), com cama de maravalha esterilizada trocada 3 vezes por semana, e mantidos sob regime de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro. Água filtrada e ração balanceada peletizada (Labina, Purina) foram oferecidos em regime *ad libitum*. Suplementação multivitamínica líquida (Vitagold) foi administrada com periodicidade quinzenal. Os animais não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de sua utilização.

O protocolo experimental utilizado neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biologia da UNICAMP (Proc. No. P632-1 e P773-1).

3.2 PREPARAÇÃO BIOLÓGICA

Os animais foram sacrificados por exsanguinação por meio de secção dos vasos sanguíneos cervicais, após concussão cerebral. Após o sacrifício do animal, a caixa torácica e o pericárdio foram abertos, e o coração foi retirado e mergulhado em solução de Krebs-Henseleit modificada (K-H) oxigenada, para retirada do excesso de sangue. A seguir, procedeu-se à dissecação do átrio direito e/ou esquerdo, que foi montado como descrito a seguir. A preparação foi mantida a $36,5 \pm 0,5$ °C, sob borbulhamento com carbogênio (95% O₂/ 5% CO₂) durante todo o experimento.

3.3 MONTAGENS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados dois tipos de montagem experimental. A primeira, mostrada na Figura 3.1, destinou-se aos experimentos para monitoração de eletrograma unidimensional, como inicialmente descrito por Zafalon (2001). A segunda montagem, mostrada na Figura 3.2, foi utilizada em experimentos com monitoração de eletrograma

bidimensional (usado para determinação do vetoatriograma). Em ambas as montagens, o átrio era mantido numa câmara de incubação, dentro de um compartimento contendo solução de K-H continuamente borbulhada com carbogênio. Este compartimento é envolvido por outro compartimento, no qual é mantido um fluxo constante de água aquecida por um sistema de circulação e aquecimento. Isto permite a manutenção da temperatura no compartimento que contém a preparação biológica.

Em ambas as montagens, uma das extremidades do átrio foi fixada a um suporte, e a outra, presa a um fio de algodão conectado a uma massa de 0,5 g (pré-carga). Também em ambos os casos, utilizou-se fios de platina (0,5 mm de diâmetro) como eletrodos para estimulação elétrica, enquanto que a captação do sinal elétrico atrial foi feita por meio de eletrodos de prata cloretada (por imersão em hipoclorito de sódio por 2 min, seguida de lavagem com água destilada, antes do início do experimento).

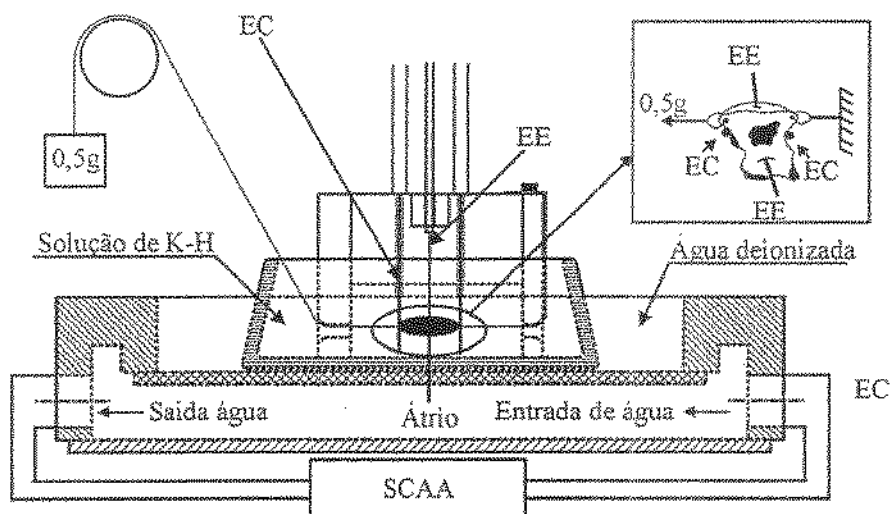


Figura 3.1 – Esquema ilustrativo da montagem horizontal do AD (Átrio Direito) para estimulação e registro de eletrograma atrial unidimensional. Nesta montagem, o átrio é preso horizontalmente por dois fios de algodão, um fixo e outro ligado a uma carga de 0,5 g. Como podemos observar no *inset* da figura, o par de eletrodos de estimulação (EE) é colocado em posição aproximadamente ortogonal com relação ao par de eletrodos de captação do eletrograma (EC). O átrio é mantido em solução de K-H continuamente borbulhada com carbogênio. A câmara onde fica o AD é envolvida por um compartimento onde circula água proveniente de um sistema de circulação e aquecimento de água (SCAA). A câmara foi feita de vidro, com exceção da parede lateral externa, que foi feita de acrílico (figura modificada de Zafalon, 2001).

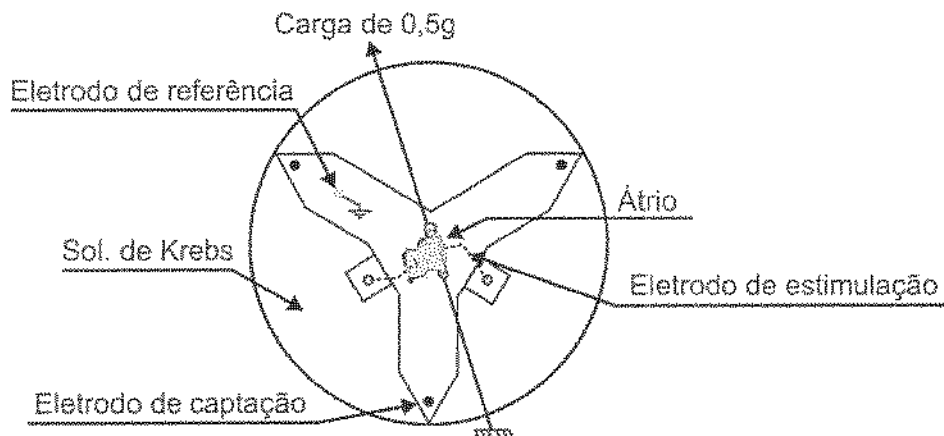


Figura 3.2 – Esquema ilustrativo da montagem atrial para captação do eletrograma atrial bidimensional. Nesta montagem, o átrio é preso como indicado na **Figura 3.1**, porém com diferente disposição dos eletrodos de captação. Um suporte de acrílico posiciona os eletrodos de prata cloretada (eletrodos de captação, pontos em preto), de maneira que estes se situem nos vértices de um triângulo aproximadamente equilátero. Em cinza escuro, está indicado o eletrodo de prata cloretada usado como referência. Para estimulação elétrica, utilizou-se eletrodos de platina (tracejado). Como na montagem da **Figura 3.1**, a câmara onde o átrio está incubado possui diâmetro de aproximadamente 35 mm e é preenchida com solução de K-H carbogenada e mantida a 36,5 °C.

3.3.1 Registro do Eletrograma Atrial

a) Eletrograma unidimensional:

Usou-se para este fim a montagem ilustrada na **Figura 3.1**. O eletrograma atrial foi captado por meio de 3 eletrodos de prata cloretada: dois de registro e um de referência. O último foi imerso na solução da câmara, afastado do átrio. Os eletrodos foram conectados a um amplificador de sinais biológicos (projeto CEB/UNICAMP nº 00-5817), utilizando um acoplador universal com entrada diferencial (Narco Biosystems mod. 7189), cuja saída foi ligada a: a) uma placa de aquisição de dados (Lynx CAD1236, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP), conectada a um computador (UPDATING, mod. BT3002), para registro e armazenamento do eletrograma, e a um osciloscópio (Tektronix TDS210), para monitoração contínua do sinal.

Para filtragem do sinal do eletrograma atrial, utilizou-se filtros passa-baixa com frequências de corte de 100 ou 300 Hz, dependendo da qualidade do sinal. A aquisição de dados feita foi a 900 Hz com resolução de 12 bits. Tanto a aquisição quanto a filtragem

foram executadas com o *software* Aqdados (Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP).

b) Eletrograma bidimensional:

Para captação do eletrograma bidimensional, foi utilizada a montagem mostrada na **Figura 3.2**. Como podemos observar, são utilizados 4 eletrodos de prata cloretada: três de registro e um de referência (este também imerso na solução da câmara, afastado do átrio). Os eletrodos foram conectados a dois amplificadores de sinais biológicos (projetos CEB/UNICAMP nº 00-5817 e 01-2575) através de 2 acopladores universais com entradas diferenciais (Narco Biosystems mod. 7189) (**Figura 3.3**). Os sinais de saída dos amplificadores de sinais biológicos foram digitalizados através de uma placa de aquisição de dados (Lynx CAD1236, Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda, São Paulo, SP), filtrados e armazenados, como no caso do eletrograma unidimensional.

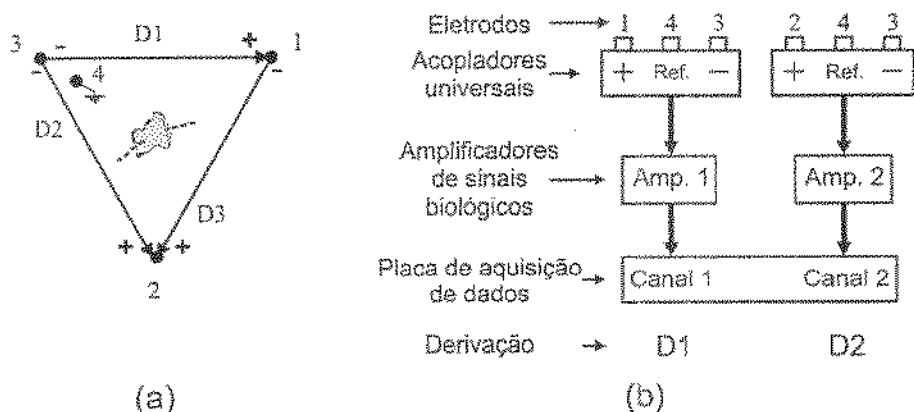


Figura 3.3 – Esquema ilustrativo do arranjo dos eletrodos para captação do eletroatriograma bidimensional. (a) triângulo de Einthoven aplicado a esta montagem experimental, que define as derivações clássicas do eletrocardiograma: eixos D1, D2 e D3. (b) maneira como os eletrodos foram conectados aos amplificadores diferenciais (por meio dos acopladores universais), para permitir o registro de duas derivações (D1 e D2).

3.3.2 Estimulação elétrica atrial

Os átrios foram estimulados eletricamente através de dois eletrodos de platina, mantidos em contato direto ou próximos da superfície atrial. A disposição dos eletrodos está mostrada nas **Figura 3.1** e **3.2**. A **Figura 3.4** ilustra o sistema completo para captação da atividade elétrica e estimulação (embora a disposição dos eletrodos tenha variado entre as montagens, os componentes da instrumentação foram essencialmente os mesmos). Foi usado um estimulador elétrico de tensão (Narco Biosystems, mod. ST-

10) comandado por um sistema de estimulação elétrica integrado a um computador. Este sistema permite controle da amplitude e dos parâmetros temporais da estimulação, e foi desenvolvido no Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP (Godoy *et al.*, 1991).

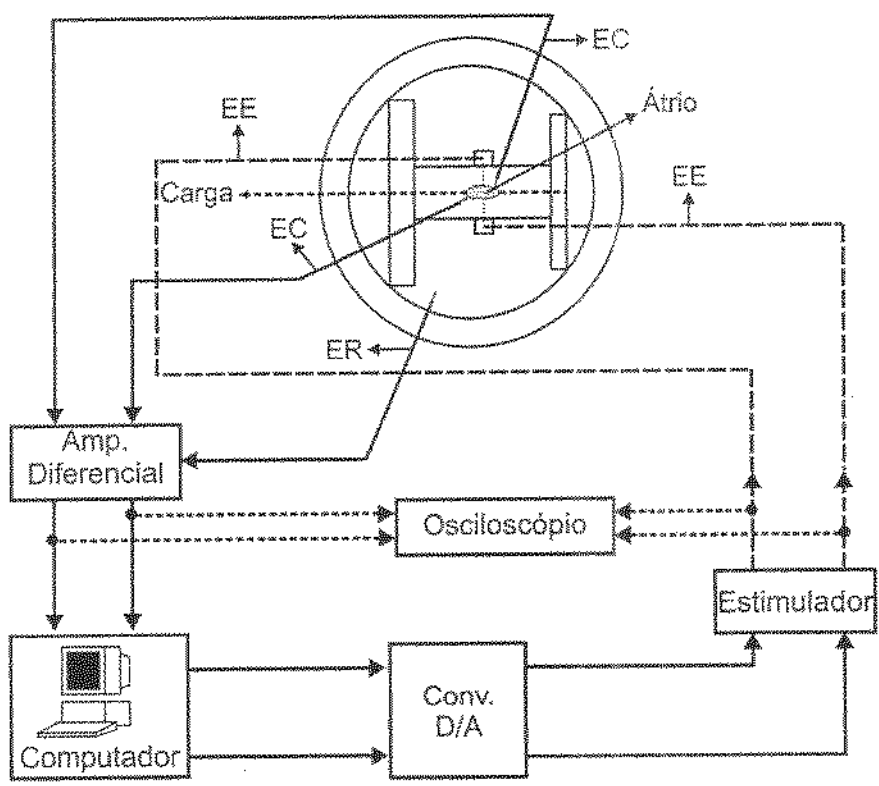


Figura 3.4 – Diagrama representativo do sistema para captação do eletrograma atrial e estimulação elétrica. Os eletrodos de registro (EC) e de referência (ER) foram conectados a um amplificador diferencial (acoplador com entrada diferencial + amplificador de sinais biológicos) que, por sua vez, era conectado a um computador. No computador, o sinal era adquirido a 900 Hz com precisão de 12 bits por meio de uma placa de aquisição, e armazenado para análise posterior. O mesmo computador foi ainda usado para comandar o processo estimulatório, por meio de uma placa de geração de sinais digitais, os quais, após conversão digital-analógica, eram usados para comandar um estimulador elétrico de tensão. A forma de onda estimulatória era aplicada através de eletrodos de estimulação (EE). O osciloscópio foi utilizado para monitoramento contínuo do sinal estimulatório e do eletrograma atrial (modificada de Zafalon, 2001).

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE MONTAGEM DOS ÁTRIOS

Este protocolo básico foi utilizado em todas as preparações, e consistiu de uma sequência de passos, desde a montagem da preparação atrial até o início do seu período de estabilização. Estes passos foram:

- a) com trens estimulatórios controlados manualmente (pulsos com amplitude de 2,1 V), determinava-se a melhor disposição espacial dos eletrodos de estimulação para a indução de TA;
- b) determinava-se o limiar estimulatório atrial (LE), isto é, a menor amplitude do estímulo capaz de iniciar atividade elétrica no átrio;
- c) procedia-se à tentativa de indução de TA (controle manual da estimulação), mantendo-se a amplitude do estímulo em LE. Em caso de sucesso, a amplitude do pulso estimulatório era fixada em $2 \times \text{LE}$, e dava-se início ao período de estabilização. Não sendo possível induzir TA, a amplitude do pulso estimulatório era aumentada progressivamente até que fosse obtido sucesso na indução. Determinava-se, então, o limiar de indução de TA (LI), isto é, a menor amplitude do estímulo capaz induzir TA. Neste caso, a amplitude do pulso estimulatório era fixada em $1,2 \times \text{LI}$ e dava-se início ao período de estabilização.

Durante o período de estabilização, os átrios direitos permaneciam contraindo-se espontaneamente por 30 minutos, sem aplicação de estimulação elétrica. Ao final deste período, era registrada a frequência espontânea inicial, e dava-se início aos experimentos de indução de TA e/ou estudo do vetoatriograma, de acordo com protocolos específicos descritos a seguir. No caso de átrios esquerdos, a preparação foi estimulada a 0,5 Hz com pulso de amplitude igual a $1,2 \times \text{LE}$ durante o período de estabilização.

3.5 INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA ATRIAL POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

3.5.1 Definições e Protocolos para Indução de TA por Estimulação Elétrica de Alta Frequência

- A) ESTÍMULO: O estímulo unitário utilizado foi um pulso de tensão retangular, bipolar simétrico, com duração total de 1 ms (i.e., 0,5 ms em cada polaridade), como mostrado na **Figura 3.5a**. A amplitude utilizada foi de $2 \times \text{LE}$ ou $1,2 \times \text{LI}$, como explicado no item 2.4.

B) TREM DE PULSOS: É o conjunto de estímulos aplicados de acordo com um padrão temporal definido. Neste trabalho, foram utilizados 2 tipos de trens de pulsos estimulatórios (Zafalon, 2001):

P1: Consiste de 50 estímulos unitários separados por um intervalo regular de 32,3 ms (30 Hz, **Figura 3.5b**).

P3: Nesta configuração, o padrão de aplicação dos estímulos foi de 3 trens sucessivos, com 20 estímulos unitários cada e intervalo inter-pulso de 14,5 ms (65 Hz), separados por pausas de 1,3 s (**Figura 3.5c**).

Tipicamente utilizamos P1 quando estudamos a ação de fármacos pró-arrítmicos, pois este protocolo possui menor potencialidade de indução de TA em condições controles, quando comparado a P3 (Zafalon *et al.*, 2004). Isto, portanto, permite que o efeito pró-arrítmico do fármaco não seja subestimado por saturação do efeito pró-arrítmico da estimulação elétrica. Por outro lado, para o teste de agentes anti-arrítmicos, o protocolo P3 é o mais adequado, pois tem alta inducibilidade de TA, o que permite ampla margem de redução da indução de TA pelo fármaco a ser testado. É importante ressaltar que, embora P1 e P3 tenham sido usados em diferentes experimentos, sempre o mesmo protocolo de estimulação elétrica foi aplicado em condições controles e experimentais numa dada preparação.

C) TENTATIVA: Definimos como tentativa a aplicação de um trem de pulsos de uma configuração qualquer (isto é, P1 ou P3), com objetivo de induzir taquiarritmia no tecido atrial. O critério utilizado para identificar a ocorrência de TA foi a presença, após término do trem de pulsos, de atividade elétrica atrial espontânea de frequência mínima de 10 Hz e duração mínima de 0,2 s.

D) EPISÓDIO: Cada episódio era composto de 8 tentativas, com trens de pulso da mesma configuração (**Figura 3.6**). Num episódio, tentativas sucessivas foram separadas por um período de 1 min. Caso uma dada tentativa evocasse TA, a próxima tentativa era iniciada 1 min após o término da arritmia. Caso a arritmia não cessasse espontaneamente num período de 20 s, sua reversão era feita por estimulação da preparação com pulsos de apresentação aleatória, após o que se aguardava um período de 1 min antes da próxima tentativa. Quando mais de um episódio era aplicado a uma preparação,

observava-se um período mínimo entre episódios de 15 min, para permitir estabilização da frequência atrial.

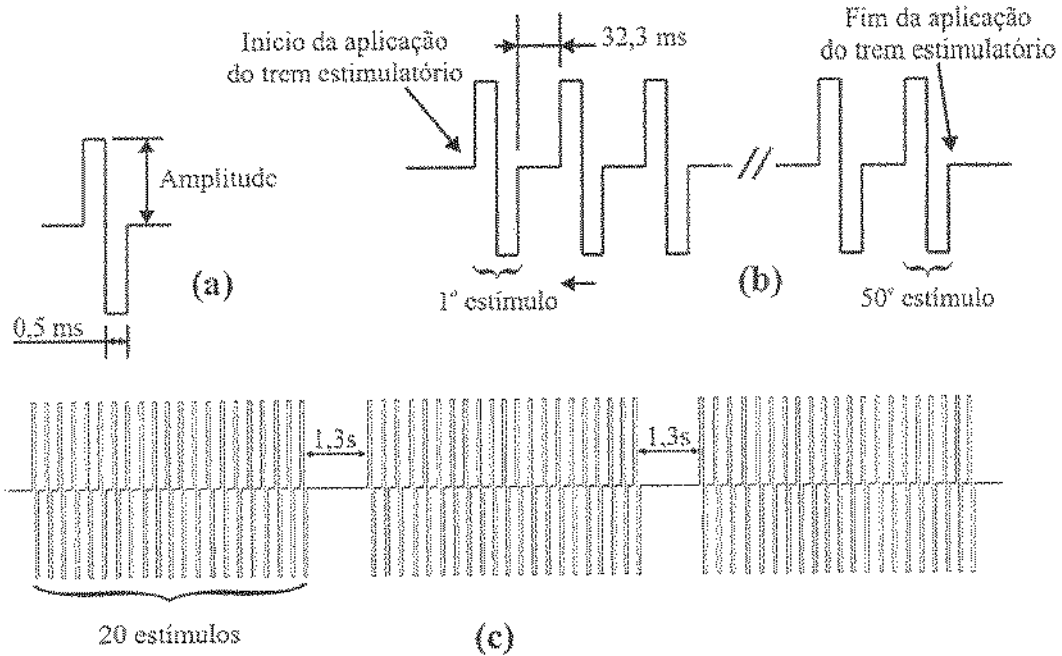


Figura 3.5 – (a) representação de um estímulo unitário, ou seja, um pulso bipolar de tensão utilizado para estimulação atrial; (b) representação do protocolo estimulatório P1; (c) representação do protocolo estimulatório P3.

E) ÍNDICE DE TAQUIARRITMIA: O índice de taquiarritmia (IT) representa a probabilidade de se induzir TA em um episódio. Ele é definido como o quociente entre o número de tentativas que efetivamente induziram TA e o número total de tentativas. Por exemplo, $IT = 0,50$ quando, num dado episódio, metade das tentativas induzem TA.

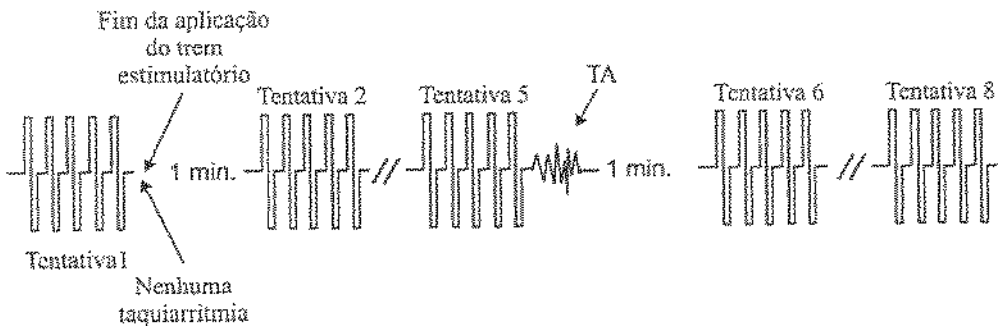


Figura 3.6 – Esquema ilustrativo de um episódio estimulatório. Um episódio foi sempre composto de 8 tentativas separadas por um intervalo de 1 minuto, durante o qual o átrio assumia atividade que acompanhava o ritmo sinusal. Se, após a aplicação de uma

tentativa, ocorria indução de TA, este intervalo era contado a partir do momento que a arritmia terminava e o ritmo sinusal era restabelecido.

3.5.2 Protocolo Estimulatório para Indução de Arritmias Dependentes de Catecolaminas em Átrios Esquerdos

Neste tipo de preparação, que não tem atividade espontânea devido à ausência de marca-passos, automatismo (arritmia) foi induzido de acordo com a abordagem descrita por Boer & Bassani (2004). A preparação foi tratada com 1 μ M ISO para estimulação de adrenoreceptores β . Dois min após a adição do fármaco, aplicou-se um trem estimulatório de 150 pulsos a 5 Hz, após o qual a estimulação elétrica foi cessada. Atividade espontânea, de frequência regular (3-5 Hz), desenvolveu-se logo após interrupção da estimulação elétrica.

3.6 INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS SOBRE A INDUÇÃO DE TAQUIARRITMIA

Em todos os casos, um ou mais episódios eram aplicados em condição controle (i.e., antes da adição do fármaco). No caso de mais de um episódio controle, em cada episódio foi utilizado um protocolo estimulatório diferente, para melhor avaliação da inducibilidade de TA em preparações individuais. A seguir, o fármaco era adicionado à solução do banho, e, após o período de estabilização adequado, aplicava-se episódio(s) com o(s) mesmo(s) protocolo(s) estimulatório(s) utilizado(s) em condição controle. Os mesmos tipos de episódios eram aplicados novamente após a lavagem do fármaco. Portanto, é importante ressaltar que, independentemente dos protocolos estimulatórios usados, eles eram sempre os mesmos para determinação de IT na ausência e na presença do fármaco.

3.7 VETOATRIOGRAMA

Os passos para obtenção do vetoatriograma são: a) captação do eletrograma atrial bidimensional, b) processamento dos sinais de eletrograma; c) composição do vetor elétrico médio (VEM).

3.7.1 Captação do Eletrograma Atrial Bidimensional

Foi utilizada a montagem mostrada na **Figura 3.2**, e os sinais nas derivações D1 e D2 foram obtidos, como indicado na **Figura 3.3**. Os eletrogramas captados definem $m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t)$, que são as coordenadas do VEM nas derivações D1 e D2, respectivamente, no sistema de coordenadas não ortogonais definido pelo triângulo de Einthoven.

3.7.2 Processamento do Sinal do Eletrograma

O processamento do sinal do eletrograma consistiu na aplicação da sequência de procedimentos mostrados na **Figura 3.7**. Esta etapa inclui a transformação das coordenadas da base originalmente não ortogonal para a base ortogonal, o que facilita o tratamento dos dados e a interpretação dos resultados do vetoatriograma.

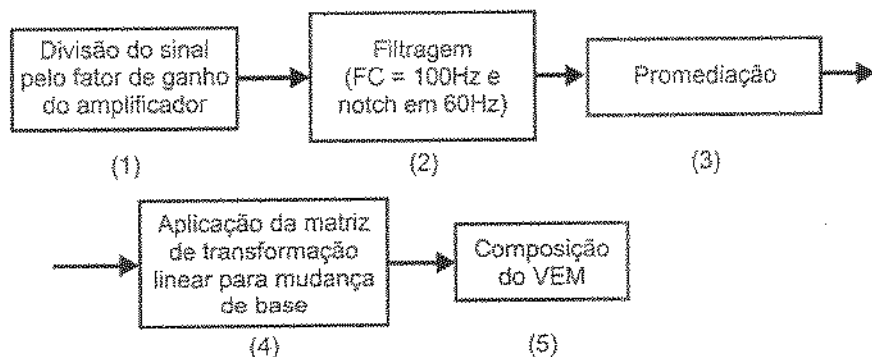


Figura 3.7 – Diagrama dos passos executados na fase de processamento dos sinais eletrográficos para a obtenção do vetoatriograma.

Com exceção da filtragem do sinal, que foi executada com o *software* Aqdados, todas as outras operações foram executadas com o programa Microsoft® Excel.

A **Figura 3.8a** apresenta um registro original obtido na derivação D1, que mostra a evolução temporal do componente $m_{D1}(t)$ do VEM. Na **Figura 3.8b**, é apresentado o mesmo registro após filtragem do sinal com a aplicação de filtro passa baixa de 100 Hz e *notch* de 60 Hz.

A operação de promediação foi feita para determinar a forma de onda média do sinal de eletrograma e aumentar a relação sinal-ruído. Para isto, foram amostrados 7 ciclos consecutivos de atividade elétrica, cujos picos positivos foram sincronizados com o pico do sinal do primeiro ciclo. A **Figura 3.9** apresenta a sobreposição dos registros simultâneos das derivações D1 e D2 após promediação. O sinal em D1 foi o mesmo apresentado na **Figura 3.8**.

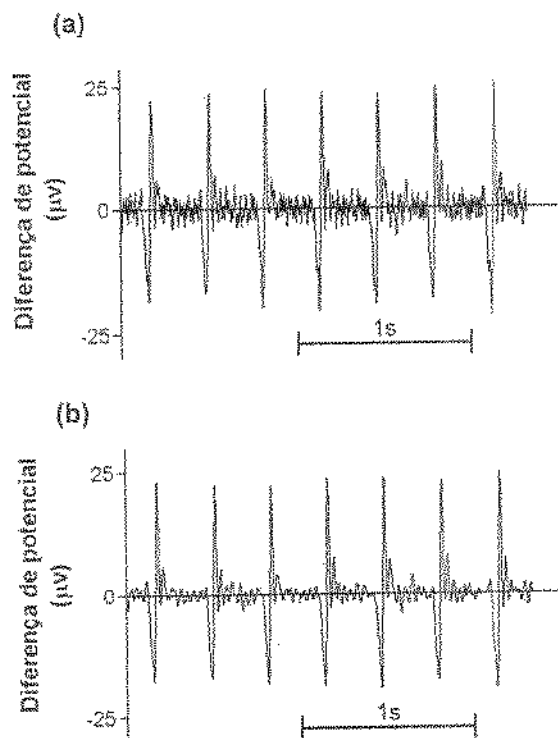


Figura 3.8 – (a) Registro eletrográfico da atividade elétrica espontânea atrial direita na derivação D1; (b) O mesmo registro após aplicação de filtro passa baixa de 100 Hz e notch de 60 Hz.

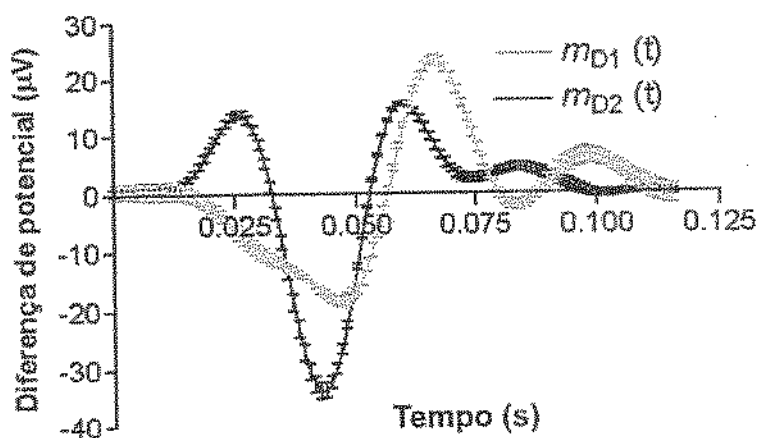


Figura 3.9 – Registro do eletrograma atrial nas derivações D1 e D2 após promediação. As barras nos traçados correspondem ao erro-padrão da média do sinal nos 7 ciclos promediados.

O procedimento (4) exige a determinação da matriz de transformação linear (Boldrini *et al.*, 1980), que será agora considerada detalhadamente. Na **Figura 3.10**, estão mostradas as operações geométricas necessárias para a determinação da matriz de transformação linear. Na **Figura 3.10a**, temos o sistema de eixos não ortogonais, onde $\vec{M}(t)$ é o VEM, e $m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t)$ são seus componentes nas derivações D1 e D2, respectivamente. Procedemos então a um deslocamento dos eixos (**Figura 3.10b**), sem qualquer prejuízo para a informação contida no sinal. Na **Figura 3.10c**, foi sobreposto ao sistema original o sistema de coordenadas ortogonais (x,y). A partir desse ponto, é possível a determinação de $m_x(t)$ e $m_y(t)$, que são os componentes de VEM no sistema ortogonal, a partir de $m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t)$, que são os componentes obtidos experimentalmente nas derivações D1 e D2. Na **Figura 3.11**, estão explicitados todos os elementos necessários para esta determinação.

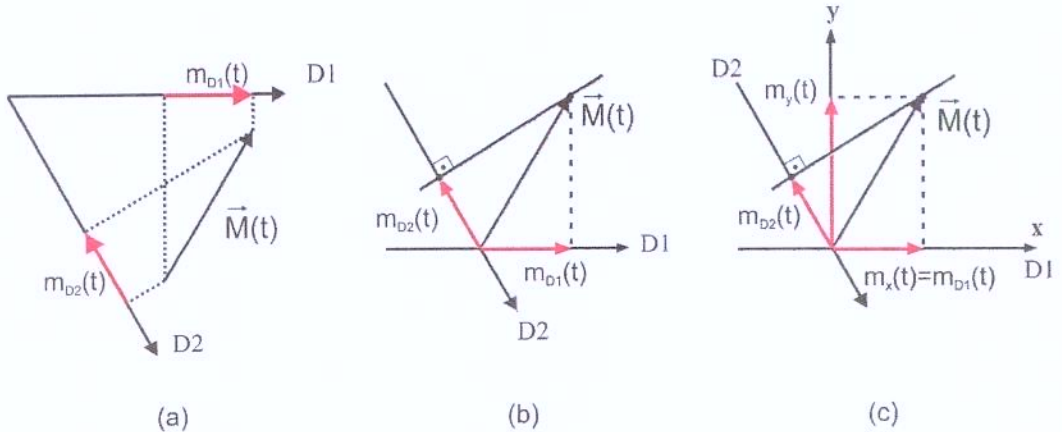


Figura 3.10: (a) Vetor elétrico médio determinado diretamente de suas coordenadas não ortogonais; (b) reposicionamento dos eixos não ortogonais; e (c) sobreposição dos eixos ortogonais aos eixos em (b).

Por simples observação da **Figura 3.11**, temos que:

$$m_x(t) = m_{D1}(t) \quad (1)$$

Pode-se perceber que $y_1(x) = \text{tg}(\alpha)x(t)$, e que $y_1(x)$ é paralela a $y_2(x)$. Destas relações, e considerando que $\alpha = 90 - \beta$ (β é o ângulo entre os eixos das derivações de medição, no caso, idealmente 60°), temos que:

$$y_2(x) = \text{tg}(90 - \beta)x + b \quad (2)$$

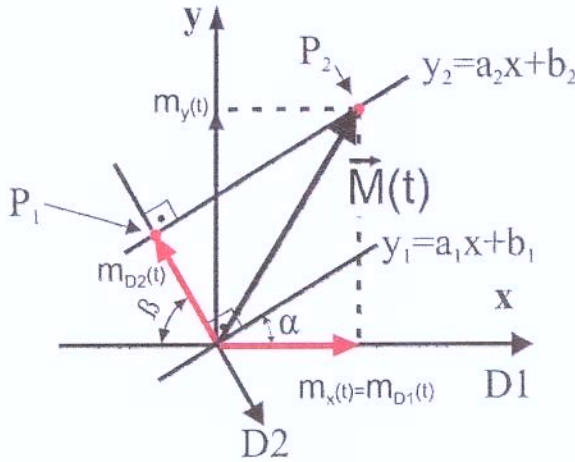


Figura 3.11: Parâmetros utilizados para a determinação da matriz de transformação das coordenadas não cartesianas em coordenadas cartesianas.

Para determinação de b , basta que tenhamos um ponto pelo qual passa $y_2(x)$. Tomemos o ponto P_1 , como mostrado na **Figura 3.11**. Suas coordenadas no sistema ortogonal são $(-\cos(\beta) \cdot |m_{D2}(t)|, \sin(\beta) \cdot |m_{D2}(t)|)$. Como $m_{D2}(t)$ possui valor negativo, pois sua orientação é no sentido decrescente do eixo **D2**, temos que $|m_{D2}(t)| = -m_{D2}(t)$. Assim, as coordenadas do ponto P_1 ficam $(\cos(\beta) \cdot m_{D2}(t), -\sin(\beta) \cdot m_{D2}(t))$. Substituindo estes valores em (2), obtemos:

$$b = -\operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot \cos(\beta) \cdot m_{D2}(t) - \sin(\beta) \cdot m_{D2}(t) \quad (3)$$

Tomando agora o ponto P_2 , cujas coordenadas no sistema cartesiano são $(m_x(t), m_y(t))$ ou $(m_{D1}(t), m_y(t))$, e substituindo, juntamente com (3), na equação (2), temos:

$$m_y(t) = \operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot m_{D1}(t) + [-\operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot \cos(\beta) - \sin(\beta)] \cdot m_{D2}(t) \quad (4)$$

Com (1) e (4), chegamos à seguinte transformação linear, que converte as coordenadas de $\vec{M}(t)$ do sistema não ortogonal para o sistema ortogonal:

$$\begin{pmatrix} m_x(t) \\ m_y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \operatorname{tg}(90 - \beta) & \operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot \cos(\beta) + \sin(\beta) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} m_{D1}(t) \\ -m_{D2}(t) \end{pmatrix} \quad (T1)$$

Para $\beta = 61^\circ$, T1 será:

$$\begin{pmatrix} m_x(t) \\ m_y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0,553 & 1,14 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} m_{D1}(t) \\ -m_{D2}(t) \end{pmatrix} \quad (T2)$$

De maneira simples, consideremos agora a análise de propagação de erros em nossos procedimentos. A conversão de $(m_{D1}(t), m_{D2}(t))$ em $(m_x(t), m_y(t))$ implica na utilização de um ângulo (β) na obtenção de β estamos sujeito à erros de medidas. Assim, o primeiro passo na análise de erros consiste em determinar o ângulo β e seu erro. Para isto, foi feita a determinação dos valores reais de β , mostrados na **Figura 3.12**.

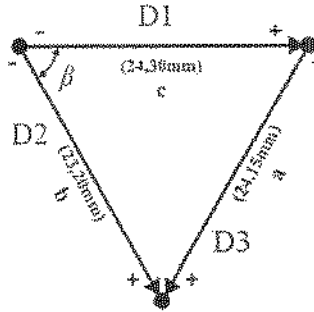


Figura 3.12: Simplificação do sistema de bases não ortogonais, onde são mostrados o ângulo β e as distâncias reais entre os eletrodos no nosso sistema experimental.

Da **Figura 3.12**, aplicando a lei dos senos ao ângulo β , obtemos:

$$\cos \beta = \frac{b^2 + c^2 - a^2}{2 \cdot b \cdot c} \quad (5)$$

, considerando que $\cos \beta = f(a, b, c) = y$.

Com a equação (5) podemos determinar o valor de β . Nela utilizamos valores de a , b e c que estão sujeitos a erros de medição. Assim, devemos calcular o erro de β a partir da imprecisão associada à a , b e c .

Da teoria de propagação de erros, temos que:

$$\Delta \bar{y} = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 \cdot (\Delta \bar{a})^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial b}\right)^2 \cdot (\Delta \bar{b})^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial c}\right)^2 \cdot (\Delta \bar{c})^2} \quad (6)$$

Considerando, de acordo com a **Figura 3.12**, $a = (24,15 \pm 0,005)$ mm, $b = (23,20 \pm 0,005)$ mm e $c = (24,30 \pm 0,005)$ mm, e aplicando (6) em (5) obtemos:

$$\Delta \bar{y} = 2,638 \cdot 10^{-4}$$

Assim,

$$\cos \beta = 0,4839 \pm 2,638 \cdot 10^{-4}$$

Assumindo que:

$$\beta = \arccos x \quad (7)$$

onde $x = 0,4839 \pm 2,638 \cdot 10^{-4}$, da teoria de propagação de erros, temos que:

$$\Delta \bar{\beta} = \left| \frac{d\beta}{dx} \right| \cdot \Delta \bar{x} \quad (8)$$

Aplicando a equação (8) à (7), chegamos a:

$$\beta = (61,06 \pm 0,02)^\circ$$

Procedemos agora à análise de propagação de erros em nossa matriz de transformação.

Como $m_x(t) = m_{D1}(t)$, temos que:

$$\Delta m_x(t) = \Delta m_{D1}(t) \quad (9)$$

De (4), sabemos que:

$$m_y(t) = \operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot m_{D1}(t) + [\operatorname{tg}(90 - \beta) \cdot \cos(\beta) - \operatorname{sen}(\beta)] \cdot m_{D2}(t)$$

Podemos escrever:

$$m_y(t) = f(\beta, m_{D1}(t), m_{D2}(t)) \quad (10)$$

Da teoria de propagação de erros:

$$\Delta m_y(t) = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial \beta} \right)^2 \cdot (\Delta \beta)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial m_{D1}(t)} \right)^2 \cdot (\Delta m_{D1}(t))^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial m_{D2}(t)} \right)^2 \cdot (\Delta m_{D2}(t))^2} \quad (11)$$

Resolvendo (11), já considerando que $\beta = (61,06 \pm 0,02)^\circ$, chegamos à seguinte expressão para $\Delta m_y(t)$:

$$\begin{aligned} (\Delta m_y(t))^2 = & [1,7046 \cdot (m_{D1}(t))^2 + 7,6021 \cdot (m_{D2}(t))^2 + 7,2 \cdot m_{D1}(t) \cdot m_{D2}(t)] \cdot (\Delta \beta)^2 + \\ & + 0,306 \cdot (\Delta m_{D1}(t))^2 + 0,369 \cdot (\Delta m_{D2}(t))^2 \end{aligned} \quad (12)$$

Com a transformação T2 e as equações (9) e (12), basta que tenhamos $m_{D1}(t) \pm \Delta m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t) \pm \Delta m_{D2}(t)$ para que seja possível determinar $m_x(t) \pm \Delta m_x(t)$ e $m_y(t) \pm \Delta m_y(t)$.

Finalmente, com a utilização da transformação linear (T2) e o procedimento para determinação do erro, podemos gerar, a partir dos registros eletrográficos das derivações D1 e D2, os sinais equivalentes na base ortogonal, como na **Figura 3.13a**, onde é mostrada a sobreposição dos componentes $m_x(t)$ e $m_y(t)$ do VEM. A partir destes componentes, é possível então, gerar o VEM (**Figura 3.13b**). O VEM mostrado na **Figura 3.13b** é o vetor associado às coordenadas $m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t)$ dos sinais mostrados na **Figura 3.9**.

3.8 ESTUDO DO EFEITO DA ABERTURA DE CANAIS DE K^+ OPERADOS POR ATP SOBRE A INDUÇÃO DE TA

Como já exposto, a redução do período refratário parece ser um fator importante na manutenção de TA (Kim *et al.*, 1996), especialmente no caso da facilitação colinérgica de TA (Liu & Natel, 1997; Kneller *et al.*, 2002). A duração do período refratário está diretamente relacionada com a duração do PA, a qual é consideravelmente reduzida por ativação de receptores colinérgicos muscarínicos atriais (Euler *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996, Sosunov *et al.*, 2002). Para investigar se o encurtamento do PA é condição suficiente para a indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência, testamos o efeito do pinacidil, um agente que aumenta a condutância da membrana ao K^+ por promover a abertura de canais operados por ATP (Fan *et al.*, 1990).

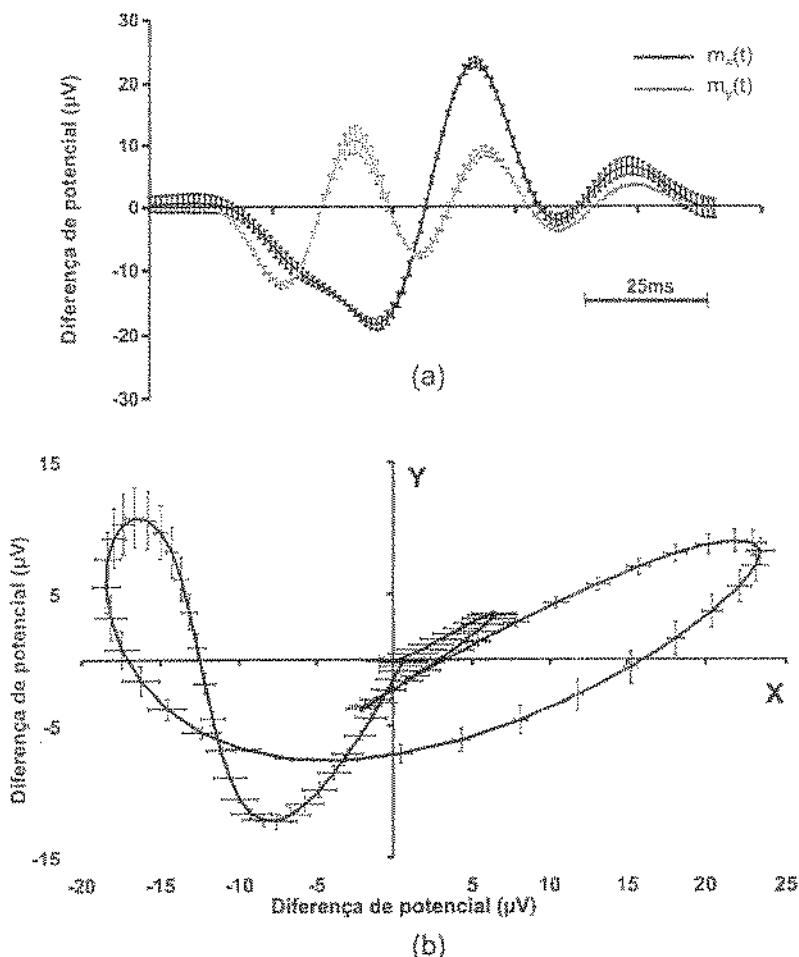


Figura 3.13: a) Sobreposição dos componentes $m_x(t)$ e $m_y(t)$ do VEM obtidos a partir dos componentes $m_{D1}(t)$ e $m_{D2}(t)$ pela aplicação da transformação T2; b) VEM composto a partir de $m_x(t)$ e $m_y(t)$. As barras correspondem ao erro padrão da média.

Com o objetivo de minimizar a influência da ACh liberada das terminações parasimpáticas pela própria estimulação elétrica e, com isso, isolar o efeito do pinacidil, alguns experimentos foram realizados na presença de atropina ($1 \mu M$), bloqueador competitivo de receptores colinérgicos muscarínicos. Nestes experimentos, IT foi determinado em condição controle (ausência de fármacos) e 30 min após a adição de atropina. A seguir, pinacidil foi adicionado cumulativamente ao meio. IT foi determinado a cada concentração de pinacidil, após um período de 7 min para estabilização do efeito. Em outros experimentos, pinacidil foi adicionado na ausência de outros fármacos ou a preparações já pré-tratadas com CCh. O efeito do pinacidil também foi testado em átrios esquerdos.

3.9 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DE FOSFATASES NO ANTAGONISMO ADRENÉRGICO-COLINÉRGICO NA INDUÇÃO DE TA

Nestes experimentos, utilizamos fluoreto de sódio (NaF) a uma concentração de 3 mM para a inibição não seletiva de fosfatases de proteínas (Neumann *et al.*, 1995). Inicialmente, IT foi determinado na ausência de fármacos. Em seguida, adicionou-se à preparação 100 μ M 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, inibidor não seletivo de fosfodiesterases, Bethke *et al.*, 1992), e, 10-30 min depois, adicionou-se o agonista β -adrenérgico ISO (100 nM). Este procedimento teve por objetivo maximizar a acumulação intracelular de cAMP e, por conseguinte, o grau de fosforilação dos substratos da PKA. Dois min após a adição de ISO, IT foi determinado novamente. A seguir, 0,6 μ M carbacol (CCh, agonista de receptores colinérgicos muscarínicos) também foi adicionado ao meio, e IT determinado 10 min depois. Em algumas preparações, a adição de CCh foi feita após incubação com NaF por 15 min.

3.10 SOLUÇÕES

A composição (em mM) da solução de K-H foi: 115 NaCl; 4,6 KCl; 2,5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,2 KH_2PO_4 ; 1,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 25 NaHCO_3 ; 11,1 glicose e 2 de ácido ascórbico; pH 7,4 sob borbulhamento com 95% O_2 , 5% CO_2 . Para o preparo da solução K-H, utilizou-se sais de padrão analítico e água destilada e deionizada.

Todos os fármacos utilizados foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA). Com exceção do pinacidil (Sigma P-154, solução-estoque de 10 mM, dimetil-sufóxido como solvente), as soluções-estoque dos demais fármacos foram aquosas, com as seguintes concentrações: 40 mM cloridrato de CCh (Sigma C4382); 10 mM sulfato de atropina (Sigma A9547); 20 mM cloridrato de (-)-ISO, (Sigma I6504); e 10 mM IBMX (Sigma I5879). As soluções-estoque dos fármacos foram mantidas a -20 °C e diluídas imediatamente antes do uso.

Para a adição de NaF (Sigma S7920) à preparação, transferimos aproximadamente 3 ml da solução de K-H da câmara de incubação para um recipiente contendo a massa adequada do sal para uma concentração de 3 mM quando diluído no volume total da câmara (20 ml). Após dissolução completa do sal, o volume retirado foi

devolvido à câmara de incubação. Não foi observada alteração do pH da solução após adição de NaF.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os valores de IT nos diferentes tratamentos farmacológicos foram comparados por meio de análise de variância monofatorial para amostras pareadas ou não pareadas, com a aplicação *post-hoc* de teste de Neuman-Keuls ou Dunnett para comparação dos contrastes. A hipótese nula (i.e., ausência de diferenças significativas) foi rejeitada quando sua probabilidade foi menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Prism, versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Capítulo 4

Resultados

4.1 O ELETROGRAMA BIDIMENSIONAL

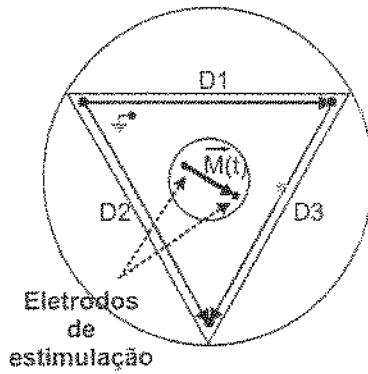
4.1.1 Validação da Montagem Experimental

Para validar a montagem, primeiramente concebemos um VEM teórico de módulo constante e que desenvolve uma trajetória circular, como mostrado na **Figura 4.1**.

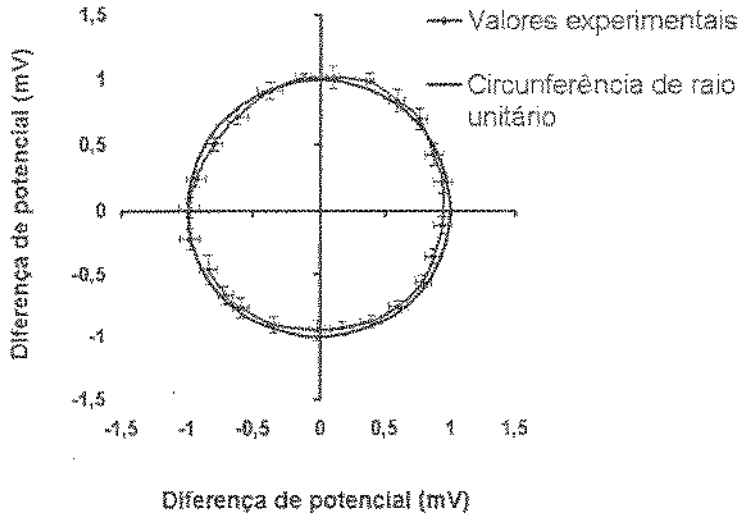


Figura 4.1 – Modelo teórico do VEM adotado para validação da montagem experimental e procedimento para determinação do vetograma. Neste modelo, VEM possui módulo constante e muda apenas sua orientação, que descreve uma circunferência.

Para estabelecer o VEM como proposto, utilizamos a montagem mostrada na **Figura 4.2a**, na qual VEM foi gerado a partir de um dipolo elétrico induzido entre os eletrodos de estimulação. A intensidade do campo elétrico do dipolo foi constante, o que implica em módulo constante do VEM, mantido em 1 mV com a aplicação de 8,2 V entre os eletrodos de estimulação. A orientação dos eletrodos foi variada, de modo a descrever uma trajetória circular. Para a obtenção da trajetória do VEM, discretizamos o círculo sobre o qual se deslocava a ponta do VEM em 24 pontos. Tomamos 5 medidas de tensão nas derivações D1 e D2 em cada ponto e determinamos a média e erro-padrão. Na **Figura 4.2b**, temos o vetograma obtido experimentalmente a partir da montagem mostrada na **Figura 4.2a**. Sobreposto ao vetograma, temos o traçado de uma circunferência (trajetória ideal teórica), o qual encontra-se dentro dos intervalos delimitados pelas barras de erro das medidas experimentais, como podemos observar. Isto nos leva a concluir que a presente abordagem experimental permite a geração de vetogramas que se comportam como o previsto por modelo teórico.



(a)



(b)

Figura 4.2 – (a) Montagem experimental para estabelecimento do VEM de módulo constante e trajetória circular. O VEM foi obtido a partir do dipolo elétrico gerado pela aplicação de uma diferença de potencial entre os eletrodos de estimulação. Para a composição do VEM, utilizamos as derivações D1 e D2; (b) Sobreposição dos traçados do VEM obtidos experimentalmente com a montagem mostrada em A, a partir dos registros eletrográficos, determinação de m_{D1} e m_{D2} e da transformação linear T2. Os pontos representam valores médios e as barras correspondem aos erros padrões da média calculados pela equação 11. Em (b), temos também o traçado de uma circunferência de raio unitário (teórico), que corresponde à trajetória ideal.

4.1.2 O Vetoatriograma sob Ritmo Sinusal

As Figuras 4.3a, b e c apresentam registros típicos de vetoatriogramas obtidos a partir de preparações atriais direitas sob ritmo gerado pelo nódulo sinusal, na ausência de qualquer agente farmacológico. Os três registros foram obtidos de preparações diferentes.

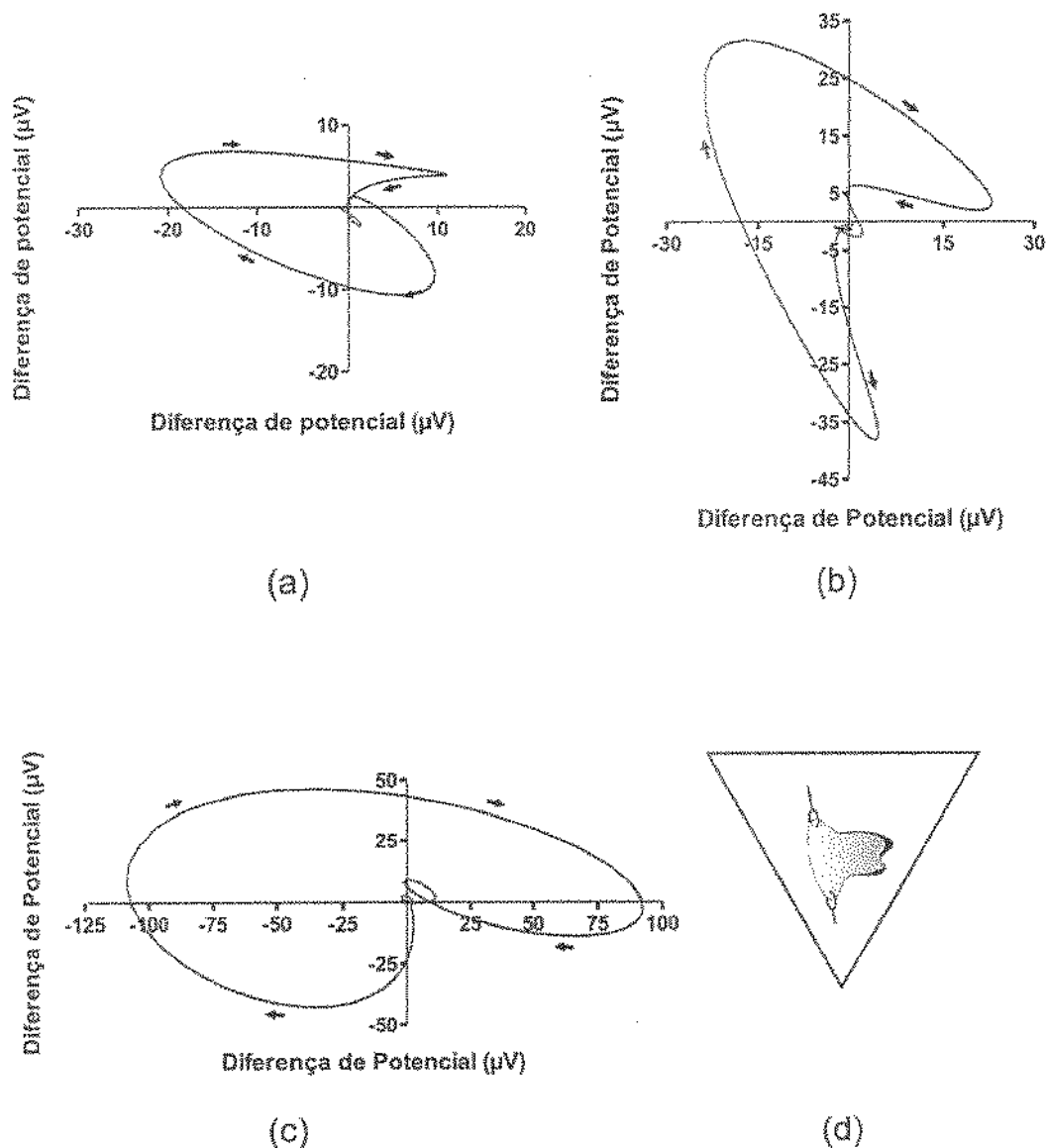


Figura 4.3 – Em (a), (b) e (c) são apresentados registros típicos de vetoatriogramas sob ritmo sinusal, registrados em átrios direitos isolados de ratos. As setas indicam o sentido do deslocamento do VEM. Em (d), mostra-se a disposição típica de um átrio, com relação ao triângulo de Einthoven.

Algumas observações podem ser feitas, a partir dos resultados no conjunto de 8 preparações estudadas:

- a) os vetoatriogramas apresentam uma forma essencialmente semelhante, embora a amplitude de VEM varie bastante entre preparações;
- b) as trajetórias do VEM sempre se desenvolvem no sentido horário;
- c) todas as trajetórias têm início e fim no ponto (0,0), o qual corresponde a ausência de atividade elétrica propagada no tecido, ou seja, repouso elétrico em todo o tecido. A passagem da trajetória por este ponto indica que a ativação elétrica atrial é precedida e sucedida por repouso elétrico.

4.1.3 O Vetoatriograma Durante Taquiarritmia (TA) de Origem Colinérgica

As Figuras 4.4a, b e c apresentam registros típicos de vetoatriogramas obtidos em diferentes preparações atriais direitas isoladas durante a ocorrência de TA induzida por estimulação elétrica de alta frequência (TA de origem colinérgica). Em comparação com os vetoatriogramas obtidos sob ritmo sinusal, observamos que:

- a) Dependendo da preparação, as trajetórias podem se desenvolver tanto no sentido horário, quanto no anti-horário;
- b) Comumente, a trajetória apresenta um grau considerável de simetria, e tende a uma elipse (exemplo, Figuras 4.4a e b);
- c) De modo independente da forma e sentido da trajetória, em nenhum momento VEM tem módulo zero. Isto indica que, não há repouso elétrico: a um dado instante sempre há atividade elétrica propagando-se em alguma parte do tecido. Isto foi observado em todas as 5 preparações estudadas.

4.1.4 O Vetoatriograma durante Arritmia de Origem Adrenérgica

Como já explicado, os mecanismos subjacentes a TA podem envolver, entre outros, o estabelecimento de circuitos reentrantes ou a ocorrência de automatismo ectópico. Para TA de origem colinérgica, propõe-se que o mecanismo de geração de manutenção seja o de excitação reentrante (Allessie *et al.*, 1984; Barville *et al.*, 1999; Vaidya *et al.* 1999; Kneller *et al.*, 2002), com o qual está em acordo o padrão de vetoatriograma que obtivemos durante TA induzida por estimulação elétrica de alta frequência, que requer a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos (Godoy *et al.*, 1999; Zafalon *et al.*, 2004).

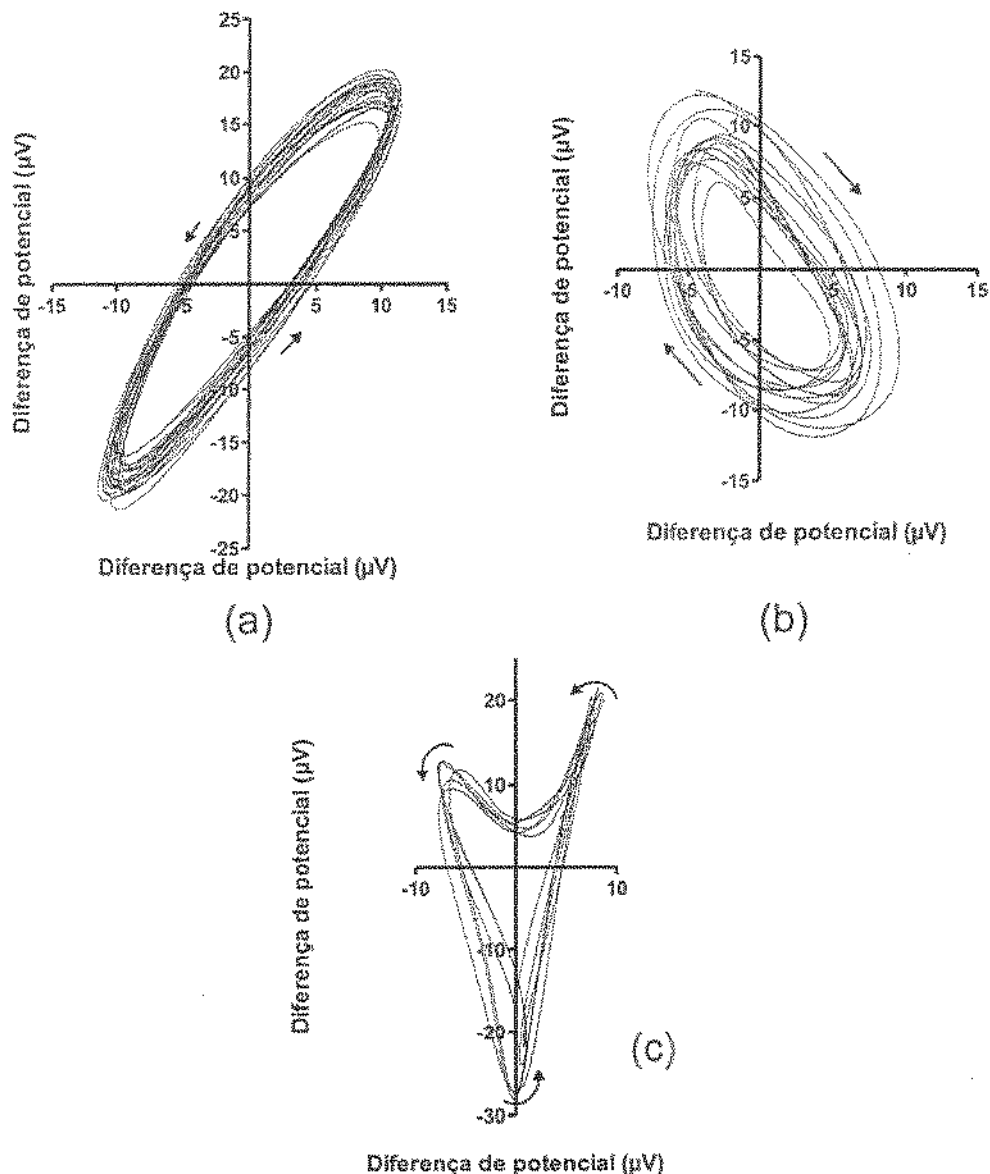


Figura 4.4 – Registros de vetoatriógramas obtidos durante a ocorrência de TA induzida por estimulação elétrica de alta frequência (TA de origem colinérgica) em diferentes preparações atriais direitas isoladas de rato. As setas indicam o sentido do deslocamento da ponta do VEM.

No entanto, espera-se que este padrão de propagação da atividade elétrica atrial seja diferente daquele que se desenvolve durante um tipo de arritmia que não necessariamente envolve a formação de circuitos reentrantes, como é o caso daquela que pode ocorrer em átrios isolados durante a exposição do átrio a altas concentrações de

agonistas β -adrenérgicos (Boer & Bassani, 2004). Neste caso, a atividade espontânea parece ser devida a automatismo ectópico e/ou sobrecarga celular de Ca^{2+} (Nash *et al.*, 2001; Bassani & Bassani, 2003; Zorn-Paully *et al.*, 2004). Para a indução deste tipo de TA utilizamos a metodologia proposta por Boer & Bassani (2004), que consiste em estimulação elétrica de átrios esquerdos isolados a 5 Hz, na presença de 1 μM ISO.

A **Figura 4.5a** apresenta a sobreposição do vetoatriograma de vários ciclos consecutivos de atividade espontânea de origem adrenérgica, enquanto que a **Figura 4.5b** mostra o vetoatriograma médio desses ciclos (i.e., após promediação). Podemos observar que o padrão de trajetória da atividade elétrica é absolutamente distinto do padrão durante TA de origem colinérgica (**Figura 4.4**). A diferença mais marcante é que, assim como no vetoatriograma registrado em átrios direitos sob ritmo sinusal (**Figura 4.3**), a trajetória do VEM tem início e fim no ponto (0,0), o que é sugestivo de que cada ciclo de atividade tenha origem numa dada região do tecido (que provavelmente assume o papel de um marca-passo), e seja precedido e seguido por um período de repouso elétrico.

4.2 TAQUIARRITMIA INDUZIDA POR ABERTURA DE CANAIS DE K^+ REGULADOS POR ATP

4.2.1 Índice de Taquiarritmia (IT)

A facilitação da ocorrência de TA por agonistas de receptores colinérgicos muscarínicos tem sido atribuída ao seu efeito de abreviar o PA, e conseqüentemente, o período refratário, o que facilitaria a reexcitação de regiões do tecido atrial, levando ao estabelecimento de circuitos reentrantes (Hoffman & Suckling, 1953; Alessie *et al.*, 1984; Euler & Scanlon, 1987; Mori *et al.*, 1995; Euler *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Mandapati *et al.*, 2000; Sosunov *et al.*, 2002; Kneller *et al.*, 2002). Para investigar se o encurtamento do PA é condição suficiente para facilitar a indução de TA, testamos o efeito do pinacidil, que atua sobre canais de K^+ regulados por ATP, causando sua abertura (Fan *et al.*, 1990).

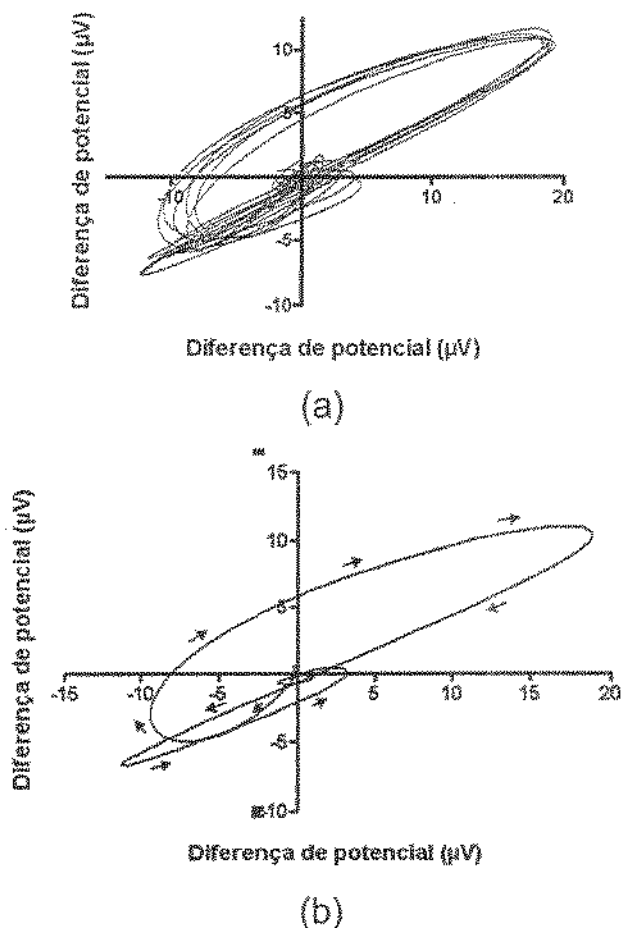


Figura 4.5 - Vetoatriograma registrado durante arritmia de origem adrenérgica (automatismo) induzida em átrio esquerdo isolado por estimulação elétrica a 5 Hz na presença de 1 μM de isoproterenol; (a) sobreposição do vetoatriograma de vários ciclos consecutivos; (b) vetoatriograma médio, após promediação dos ciclos apresentados em (a).

A Tabela 4.1 e a Figura 4.6 apresentam os resultados dos experimentos com pinacidil, aplicado cumulativamente a átrios direitos na ausência de outros fármacos. Neste caso, usou-se o protocolo P1, que tem menor eficiência de indução de TA em condições controles. Pinacidil, nas concentrações utilizadas, não alterou significativamente a frequência atrial espontânea ($p = 0,628$, análise de variância monofatorial para amostras pareadas), porém, apresentou um efeito arritmogênico significativo, caracterizado pelo aumento de IT ($p = 0,015$, análise de variância monofatorial para amostras pareadas), especialmente nas concentrações de 10 e 20 μM ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, teste de Dunnett). Após lavagem do fármaco, tanto a

freqüência espontânea, quanto IT não foram significativamente diferentes dos valores controle ($p= 0,457$ e $0,720$, respectivamente, teste de t para amostras pareadas), o que indica que o efeito do pinacídil sobre IT é reversível.

Tabela 4.1 – Valores do índice de indução de taquiarritmia (IT) e da freqüência espontânea (em batimentos por minuto, bpm) em átrios direitos isolados de ratos na ausência (controle) e na presença de pinacídil, e após a lavagem. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (N = 4). * $p < 0,05$ com relação ao controle (teste de Dunnett). Nestes experimentos foi utilizado o protocolo estimulatório P1.

	Controle	Pinacídil			Lavagem
		5 μ m	10 μ m	20 μ m	
IT	0,09 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,17 *	0,66 $\pm$ 0,06 *	0,06 $\pm$ 0,04
Freqüência (bpm)	226 $\pm$ 9	211 $\pm$ 6	219 $\pm$ 6	219 $\pm$ 9	211 $\pm$ 12

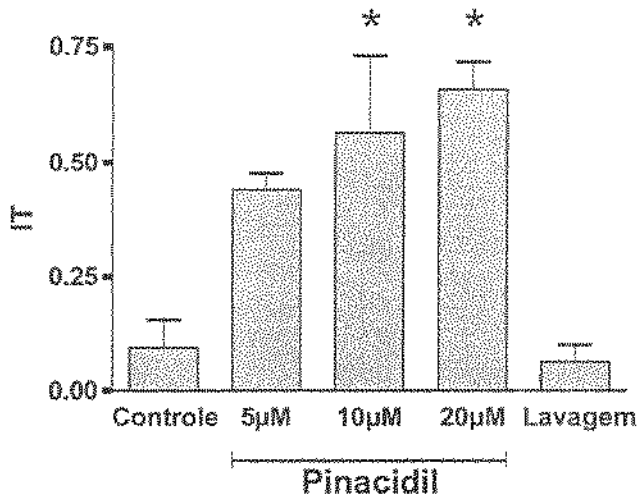


Figura 4.6 – Valores médios do índice de indução de taquiarritmia (IT) determinado em átrios direitos isolados de rato na ausência (controle) e na presença de pinacídil, e após lavagem. As linhas verticais indicam os EPM. * $p < 0,05$ com relação ao controle (teste de Dunnett). N = 4.

A seguir, o efeito do pinacídil foi testado em preparações pré-tratadas com CCh (Tabela 4.2 e Figura 4.7). CCh causou redução significativa da freqüência espontânea atrial e aumento significativo de IT, de modo dependente da concentração ($p= 0,012$ e $p< 0,001$, respectivamente; análise de variância para amostras pareadas). Curiosamente,

quando pinacidil foi aplicado a seguir, observou-se redução significativa de IT, embora sem efeito algum sobre a frequência atrial ($p < 0,001$ e $p = 0,995$, respectivamente; análise de variância para amostras pareadas).

Tabela 4.2 – Valores do índice de indução de taquiarritmia (IT) e da frequência espontânea (em bpm, batimentos por minuto) em átrios direitos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), na presença de 0,3 e 0,6 μM carbacol (CCh) e na presença de 5, 10 e 20 μM de pinacidil. Os fármacos foram aplicados de modo cumulativo. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (N = 4). *, $p < 0,05$ vs. controle; #, $p < 0,01$ vs. 0,6 μM CCh (teste de Dunnett). O protocolo utilizado foi P1.

	Controle	CCh		Pinacidil		
		0,3 μM	0,6 μM	5 μM	10 μM	20 μM
IT	0,06 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,08 *	0,31 $\pm$ 0,08 #	0,22 $\pm$ 0,15 #	0,12 $\pm$ 0,05 #
Frequência (bpm)	223 $\pm$ 3	118 $\pm$ 40 *	76 $\pm$ 26 *	82 $\pm$ 28	85 $\pm$ 30	85 $\pm$ 29

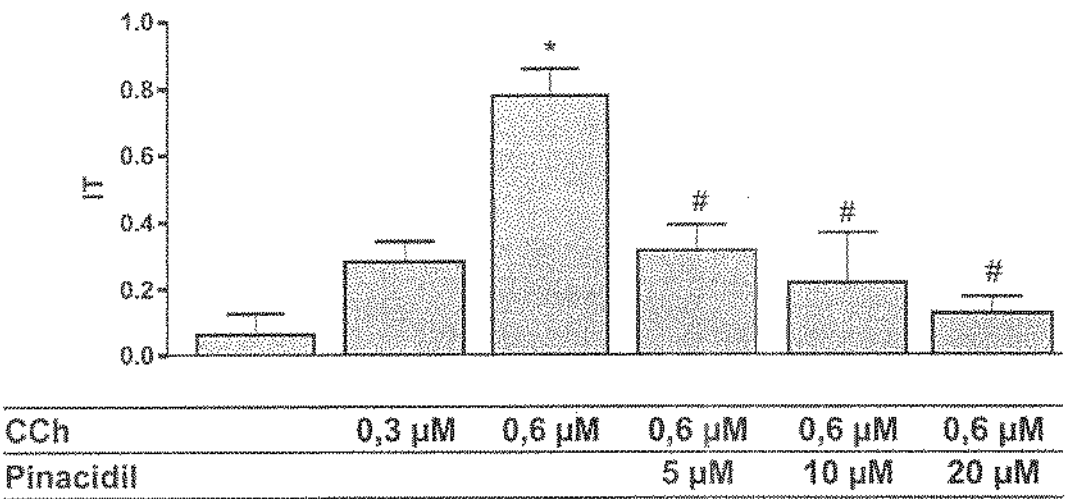
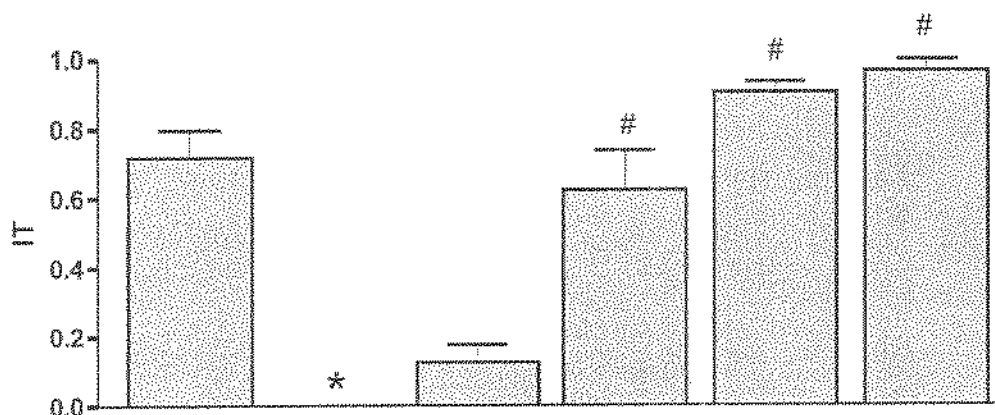


Figura 4.7 – Valores médios do índice de indução de taquiarritmia (IT) determinado em átrios direitos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), após adição de 0,3 e 0,6 μM carbacol (CCh) e pinacidil. Os fármacos foram adicionados de modo cumulativo. As linhas verticais indicam os EPM. * $p < 0,01$ vs. controle; # $p < 0,01$ vs. 0,6 μM CCh (teste de Dunnett). O protocolo utilizado foi P1. N = 4.

A observação de que pinacidil potencializou o efeito pró-aritmico da ACh endógena liberada, embora inibisse o efeito do CCh exógeno, pode ser sugestiva de que o pinacidil facilite a liberação neural do neurotransmissor para-simpático durante a estimulação elétrica. Para testar esta possibilidade e, com isso, isolar o efeito direto do pinacidil sobre o tecido atrial, repetimos os experimentos na presença de atropina (bloqueador dos receptores colinérgicos muscarínicos), usando o protocolo P3. Este protocolo, que é mais efetivo para indução de TA que o P1, foi escolhido para confirmação de total bloqueio da facilitação colinérgica de TA pela atropina. A **Tabela 4.3** e a **Figura 4.8** apresentam os resultados destes experimentos. A adição de atropina não modificou a frequência atrial espontânea ($p = 0,391$, teste t de Student para amostras pareadas). Em átrios pré-tratados com atropina, foi detectado efeito cronotrópico negativo do pinacidil ($p = 0,027$, análise de variância monofatorial para amostras pareadas), embora este efeito fosse aparente apenas para a concentração de $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$, teste de Dunnet), maior que a máxima concentração utilizada nos experimentos anteriores, nos quais não se observou efeito cronotrópico do pinacidil. Na concentração de $1 \mu\text{M}$, atropina foi capaz de abolir totalmente a indução de TA pela estimulação elétrica ($p = 0,003$, teste t para amostras pareadas), como observado previamente (Godoy *et al.*, 1999; Zafalon *et al.*, 2001). No entanto, mesmo na presença de atropina, pinacidil apresentou um marcante efeito pró-aritmico, que foi dependente da sua concentração ($p < 0,001$, análise de variância monofatorial para amostras pareadas; $p < 0,01$ para as concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$ de pinacidil vs. atropina apenas, teste de Dunnett). Este resultado indica que pinacidil apresenta efeito pró-aritmico independente da liberação de ACh neural ou da interação do neurotransmissor e/ou do pinacidil com receptores colinérgicos muscarínicos atriais.

Tabela 4.3 – Valores do índice de indução de taquiarritmia (IT) e da frequência espontânea (em bpm, batimentos por minuto) em átrios direitos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), na presença de $1 \mu\text{M}$ de atropina e após adição cumulativa de 10, 20, 30 e $50 \mu\text{M}$ de pinacidil. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (N= 4). * $p < 0,01$ vs. controle; #, $p < 0,01$ vs. atropina apenas (teste t de Student para amostras pareadas e teste de Dunnett, respectivamente). Utilizou-se o protocolo P3.

	Controle	Atropina	Pinacidil			
		$1 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$	$30 \mu\text{M}$	$50 \mu\text{M}$
IT	$0,72 \pm 0,08$	$0 \pm 0^*$	$0,12 \pm 0,05$ #	$0,62 \pm 0,11$ #	$0,91 \pm 0,03$ #	$0,97 \pm 0,03$ #
Frequência	211 ± 6	210 ± 7	208 ± 6	204 ± 9	205 ± 6	193 ± 7 #



Atropina	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM	1 μM
Pinacidil		10 μM	20 μM	30 μM	50 μM

Figura 4.8 – Valores médios do índice de indução de taquiarritmia (IT) determinado em para átrios direitos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), após adição de 1 μM atropina e pinacidil (10-50 μM). Os fármacos foram adicionados de modo cumulativo. As linhas verticais indicam os EPM (N= 4). * p< 0,05 vs. controle (teste t de Student para amostras pareadas); # p< 0,05 vs. atropina (teste de Dunnett). O protocolo utilizado foi P3.

Por fim, a Tabela 4.4 e a Figura 4.9 mostram os resultados dos experimentos com pinacidil em átrios esquerdos isolados. Estas preparações, além de não apresentarem atividade espontânea, possuem inervação autonômica bem menos densa do que átrios direitos (Hoover *et al.*, 2004), e foram usadas com o propósito de se minimizar a influência da liberação dos neurotransmissores endógenos sobre a indução de TA. Nestes experimentos, a preparação foi estimulada eletricamente apenas durante as tentativas de indução de TA, e o protocolo usado foi P3. Como podemos observar, IT em condições controles não foi estatisticamente diferente de zero, o que mostra a baixa efetividade da estimulação elétrica em induzir TA neste tipo de preparação, mesmo com o uso de um protocolo estimulatório capaz de induzir TA em mais que 70% das tentativas em átrio direito (Figura 4.8, controle). No entanto, a aplicação de pinacidil causou um aumento considerável de IT (p< 0,001, análise de variância monofatorial para amostras pareadas), de modo semelhante àquele observado em átrios direitos expostos a atropina, o que confirma que este agente pode facilitar a indução de TA mesmo na ausência de pronunciada ativação de receptores colinérgicos muscarínicos. Após lavagem, o efeito do

pinacidil foi revertido ($p = 0,423$ vs. controle, teste t para amostras pareadas), do mesmo modo que em átrios direitos.

Tabela 4.4 – Valores do índice de indução de taquiarritmia (IT) em átrios esquerdos isolados de ratos na ausência (controle) e na presença de pinacidil. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (N = 3). * $p < 0,01$ vs. controle (teste de Dunnett). O protocolo utilizado foi P3.

	Controle	Pinacidil				Lavagem
		5 μ M	10 μ M	20 μ M	30 μ M	
IT	0,04 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04 *	0,75 $\pm$ 0,07 *	0,75 $\pm$ 0,07 *	0,08 $\pm$ 0,04

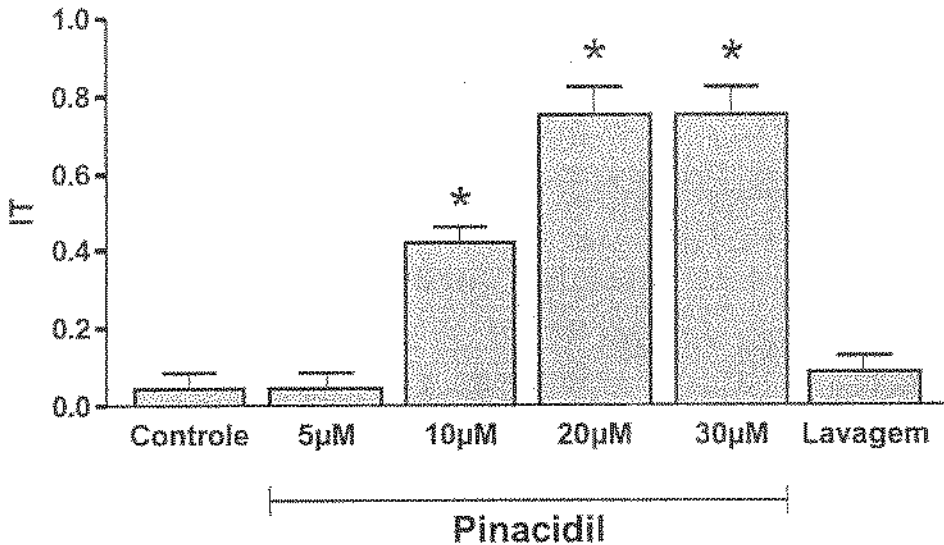


Figura 4.9 – Valores médios do índice de indução de taquiarritmia (IT) determinado em átrios esquerdos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), na presença de pinacidil e após lavagem. As linhas verticais indicam o EPM (N= 3). * $p < 0,01$ vs. controle (teste de Dunnett). O protocolo utilizado foi P3.

4.2.2 Vetoatriograma

Como podemos observar, pinacidil, mesmo na presença de atropina, mimetiza o efeito da estimulação colinérgica muscarínica quanto à facilitação da indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência. A questão que se apresenta, no entanto, é se a

TA induzida por pinacidil é semelhante àquela de origem colinérgica quanto ao padrão de propagação da atividade elétrica. Para responder esta pergunta, determinamos o vetoatriograma durante TA induzida por pinacidil ($20\ \mu\text{M}$) na presença de $1\ \mu\text{M}$ atropina em átrio direito isolado, que está apresentado na **Figura 4.10**. Como podemos observar, o vetoatriograma é muito semelhante àqueles obtidos durante TA de origem colinérgica (apresentados na **Figura 4.4**). Em ambos os casos, a trajetória é estável, elipsóide e nunca passa pelo ponto (0,0), o que indica que a atividade elétrica é continuamente propagada (não há repouso elétrico), como esperado para um ciclo reentrante de atividade elétrica (veja eletrograma para modelo de propagação circular, **Figura 4.2b**).

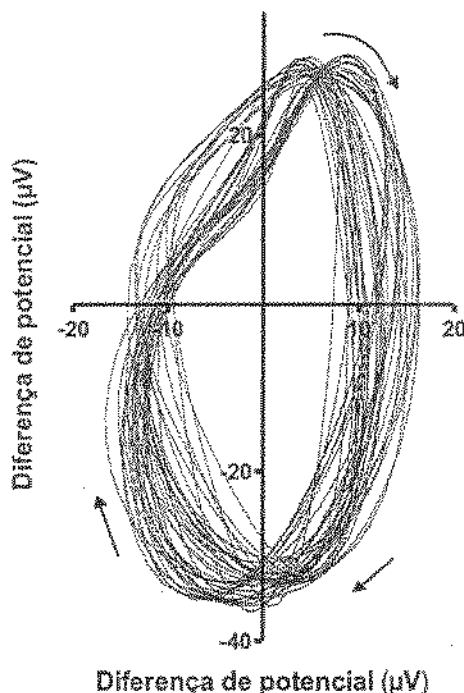


Figura 4.10 – Vetoatriograma de ciclos consecutivos durante TA induzida por pinacidil ($20\ \mu\text{M}$) em átrio direito isolado tratado com $1\ \mu\text{M}$ atropina.

4.3 ENVOLVIMENTO DE FOSFATASES NA FACILITAÇÃO COLINÉRGICA DE ARRITMIA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA EM ÁTRIO DIREITO DE RATO

Havíamos observado anteriormente que o tratamento de átrios direitos com CCh apresentava um efeito pró-arritmico, enquanto que a estimulação de receptores β -

adrenérgicos reduzia a indução de TA por estimulação elétrica de alta frequência (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2001, 2004). A **Figura 4.11** demonstra que ambos os efeitos são dependentes da concentração do agonista. Observe-se que a adição de CCh facilita de modo marcante a indução de TA pelo protocolo P1, que é pouco efetivo na ausência do agonista. Por outro lado, a indução de TA pelo protocolo P3, que ocorria em ~75% dos casos, foi consideravelmente inibida por ISO.

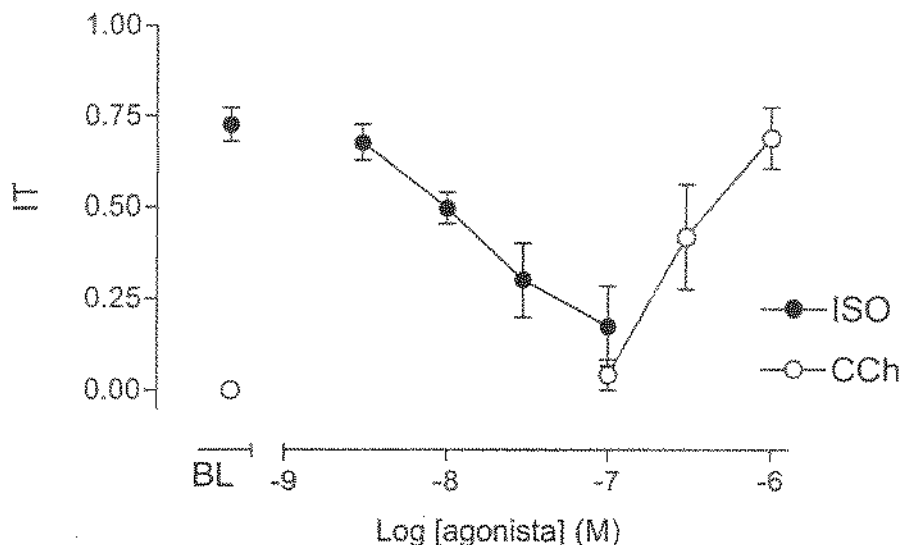


Figura 4.11 – Relação concentração-efeito do isoproterenol (ISO) e carbacol (CCh) sobre o índice de taquiarritmia (IT) em átrios direitos isolados de rato. BL (à esquerda) indica o IT controle (i.e., na ausência de fármacos exógenos). Para o teste com ISO e CCh foram utilizados protocolos estimulatórios P3 e P1, respectivamente (N = 5 para ambos os agonistas).

Havíamos identificado que a regulação da concentração intracelular de cAMP parece ser um mecanismo de convergência do antagonismo adrenérgico-colinérgico na indução de TA, pois o efeito da estimulação β -adrenérgica podia ser mimetizado por inibidores das fosfodiesterases. No entanto, este não parecia ser o único mecanismo envolvido, já que a redução de IT por inibição da degradação do cAMP podia ser revertida pela administração de agonista muscarínico exógeno (CCh) (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2001, 2004). Isto sugere, além da existência de um mecanismo adicional, que tal mecanismo atuaria numa etapa posterior ao controle da concentração de cAMP na

cascata de transdução β -adrenérgica. Como complemento ao estudo iniciado previamente (Zafalon, 2001), investigamos aqui o possível papel de fosfatases estimuladas pela via muscarínica como mecanismo independente do controle da síntese e/ou degradação de cAMP.

Para inibir fosfatases de proteínas de modo não seletivo, utilizamos o NaF (3 mM). Nesta concentração, NaF não alterou significativamente a frequência atrial espontânea ($3,70 \pm 0,01$ Hz e $3,50 \pm 0,59$ Hz na ausência e presença de NaF, respectivamente, $p=0,511$, $N=4$), o que indica não ter havido ativação importante, pelo fluoreto, de proteínas ligantes de GTP acopladas a receptores colinérgicos muscarínicos e β -adrenérgicos (Bigay *et al.*, 1985).

A Tabela 4.5 e a Figura 4.12 apresentam os resultados dos experimentos com NaF. Nestes experimentos, nos quais foi utilizado protocolo de indução P3, maximizou-se a acumulação intracelular de cAMP (com o objetivo de maximizar a fosforilação dependente de PKA) pelo tratamento conjunto com $0,1 \mu\text{M}$ ISO e $100 \mu\text{M}$ IBMX. Podemos observar que este tratamento aboliu totalmente a indução de TA por estimulação elétrica, efeito este que não foi modificado pela adição posterior de NaF (Tabela 4.5). Na ausência de NaF, a adição subsequente de $0,6 \mu\text{M}$ de CCh reverteu o efeito de ISO+IBMX, restaurando IT ao valor controle. Porém, na presença de NaF, este efeito do CCh foi consideravelmente suprimido ($p < 0,05$ vs. ISO+IBMX+CCh), o que está de acordo com a proposta de que a ativação de fosfatases pela estimulação colinérgica participe na reversão do efeito antiarritmico da acumulação intracelular de cAMP.

Tabela 4.5 – Valores do índice de indução de taquiarritmia (IT) em átrios esquerdos isolados de ratos na ausência de fármacos (controle), na presença de ISO ($0,1 \mu\text{M}$) + IBMX ($100 \mu\text{M}$), após adição de NaF (3 mM), e após adição cumulativa de CCh ($0,6 \mu\text{M}$) na ausência ou presença de NaF. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. O número de experimentos está indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ para ISO+IBMX+CCh vs. ISO+IBMX+NaF+CCh (teste de Neuman-Keuls). O protocolo utilizado foi P3.

Controle	ISO+IBMX	ISO+IBMX+CCh	ISO+IBMX+ NaF	ISO+IBMX+NaF +CCh
$0,47 \pm 0,1$ (8)	0 ± 0 (6)	$0,63 \pm 0,1$ (6)	0 ± 0 (3)	$0,14 \pm 0,1$ * (7)

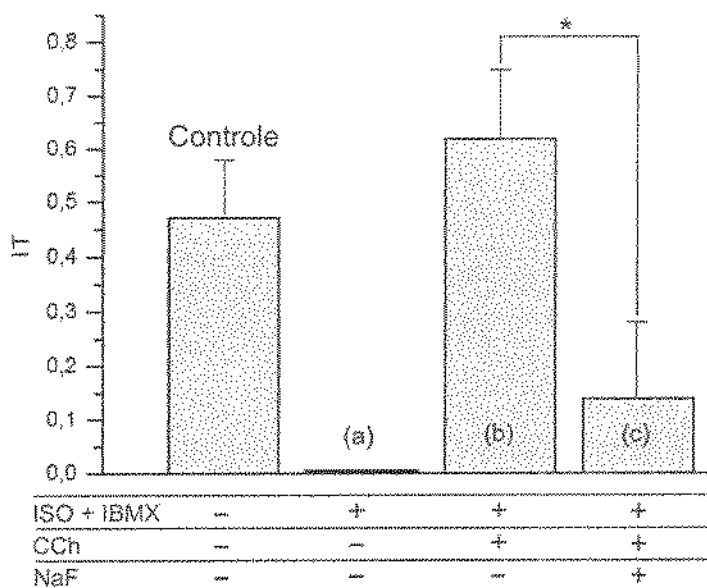


Figura 4.12 – Efeito da inibição de fosfatases por NaF sobre o índice de TA (IT) em átrios direitos isolados de rato estimulados eletricamente a alta frequência (protocolo P3). Inicialmente, IT foi determinado na ausência de fármacos (controle). A seguir, a indução de TA foi suprimida pelo tratamento com 100 μ M IBMX + 0,1 μ M ISO, para maximização da acumulação intracelular de cAMP. IT foi restaurado a valores controles pela adição subsequente de 0,6 μ M CCh, mas não quando o agonista foi administrado durante inibição de fosfatases por 3 mM NaF. * $p < 0,05$, teste de Neuman-Keuls.

Capítulo 5

Discussão e Conclusões

5.1 VETOATRIOGRAMA E ARRITMIAS ATRIAIS

O vetocardiograma é uma importante ferramenta utilizada na clínica médica, que permite diagnosticar arritmias, distúrbios de condução, e alteração do eixo elétrico do coração que pode ocorrer, por exemplo, devido a hipertrofia ventricular (Pipberger & Carter, 1962; Lopes *et al.*, 2006).

Neste trabalho, desenvolvemos uma abordagem metodológica para determinação do vetoeletrograma em tecido atrial isolado de rato (vetoatriograma), com o objetivo de estudar o padrão de propagação elétrica durante atividade elétrica de origem sinusal e durante TA. A viabilidade da aplicação do vetograma exige que a fonte geradora do sinal elétrico (na clínica médica, o músculo cardíaco, e neste trabalho, o átrio isolado) possa ser tratada como um elemento pontual, cujo sinal obedece ao princípio da superposição. A satisfação do princípio da superposição pode ser testada experimentalmente, aplicando-se um sinal com características conhecidas e verificando-se se o sinal medido é compatível com o sinal teórico esperado. O resultado obtido com a geração de um dipolo conhecido, deslocado numa trajetória circular, mostra que nossa montagem é capaz de registrar com fidelidade o sinal gerado por uma fonte com dimensões próximas às das preparações atriais, o que confirma que o sinal pode ser tratado como classicamente o é no vetocardiograma.

Dada a sua natureza vetorial, o vetoatriograma consiste em uma ferramenta útil para o estudo da propagação da atividade elétrica em tecido muscular. Considerando os vetoatriogramas obtidos em preparações sob ritmo sinusal, observamos que a trajetória apresenta variações entre preparações, às quais atribuímos principalmente a diferenças no posicionamento do átrio e eletrodos de registro entre os experimentos. No entanto, deve-se destacar o fato dos registros apresentarem importantes características que foram essencialmente semelhantes entre as preparações, tais como a direção de propagação da atividade elétrica (trajetória do VEM em sentido horário) e origem dos ciclos no ponto (0,0). Esta última característica indica que a ativação elétrica atrial de origem sinusal é sempre precedida e sucedida por repouso elétrico de todo o tecido. Portanto, cada ciclo de atividade elétrica iniciado no nódulo sinoatrial corresponderia a uma única onda de propagação, que se extingiria após completa repolarização das células de todo o tecido.

Em contraste, se um ou mais circuitos de reentrância se estabelecem durante um episódio de TA, espera-se auto-regeneração da propagação da atividade elétrica, que poderia ocorrer repetidas vezes em cada circuito após um único ciclo de ativação elétrica

(gerado por marca-passos no tecido, ou mesmo por um estímulo elétrico). A **Figura 5.1** apresenta um modelo simplificado de propagação em um único circuito reentrante, representado por um pedaço circular de tecido muscular, no qual a frente de onda despolarizante (hachurado) descreve uma trajetória espiral (**Figura 5.1a**). O estado de refratariedade do tecido está associado ao tom de cinza utilizado: em branco, representa-se a região do tecido que está em condições de ser excitada, enquanto que aquela mostrada em preto está totalmente refratária. Como podemos observar, a frente de onda sempre encontra, imediatamente à sua frente, tecido em condições de ser excitado. Na **Figura 5.1b**, está apresentada a trajetória de VEM ($\vec{M}$), obtido a partir de sua decomposição, como mostrado na **Figura 5.1c**. Portanto, uma trajetória (ou ciclo reentrante) seria completada de t_1 a t_4 . O padrão de propagação da atividade elétrica adotado na **Figura 5.1** foi baseado no modelamento descrito por Kneller *et al.* (2002), segundo o qual a frente de onda de uma atividade reentrante de origem colinérgica evolui na forma de uma espiral. Embora se trate de um modelo computacional, os resultados de Kneller *et al.* (2002) concordam com observações feitas em preparações biológicas (Mandapati *et al.*, 2000; Bian & Tung, 2006; Bursac & Tung, 2006).

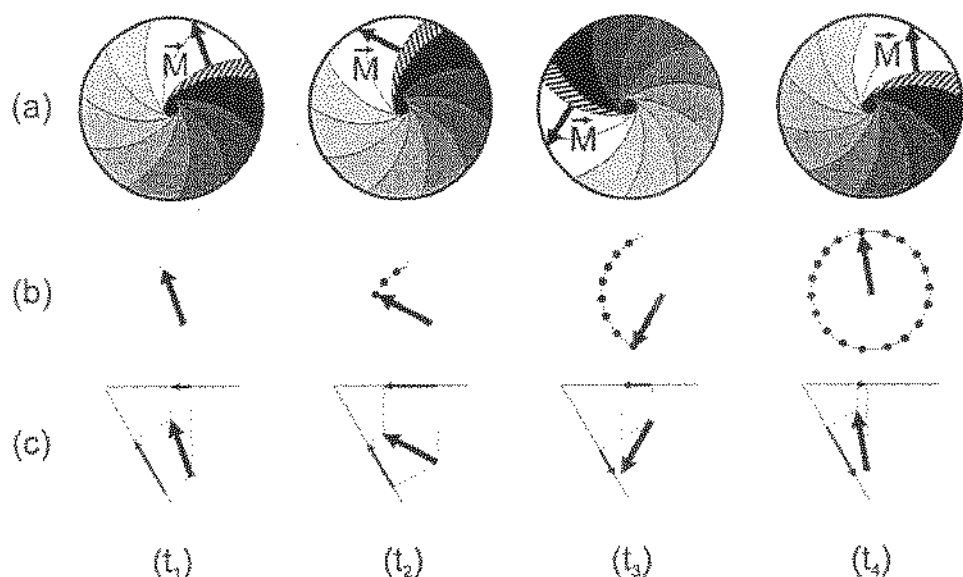


Figura 5.1: Modelo simplificado da evolução temporal de um único circuito reentrante. a) pedaço circular de tecido muscular, no qual a frente de onda despolarizante (hachurado) descreve uma trajetória espiral; b) trajetória de VEM ($\vec{M}$); c) componentes do VEM no sistema de coordenadas não ortogonais.

Deve-se ressaltar que o vetoatriograma do modelo do circuito reentrante na **Figura 5.1** é circular, e não passa pelo ponto (0,0), devido à perpetuação da propagação por este circuito, de forma que, durante ciclos repetidos de propagação, em momento algum há repouso elétrico simultaneamente em todo o tecido. É notável a semelhança qualitativa do eletrograma predito para este modelo e aquele registrado em átrios direitos isolados durante TA evocada por estimulação elétrica de alta frequência, a qual foi demonstrada previamente ter origem colinérgica (Godoy *et al.*, 1999; Zafalon *et al.*, 2004). Como no modelo proposto, a trajetória da ponta do VEM não passa pelo ponto (0,0), ou seja, durante a ocorrência de TA não há repouso elétrico. Isto significa que a todo instante há propagação de atividade elétrica em alguma região do tecido. A regularidade da trajetória durante ciclos consecutivos e a não existência de uma direção preferencial de propagação durante este tipo de TA em diferentes preparações também são observações consistentes com a ocorrência de circuitos reentrantes. Deve-se mencionar que reentrância tem sido consistentemente observada em TA de origem colinérgica, em miocárdio de várias espécies animais, e considerada como o principal mecanismo de instalação e manutenção deste tipo de arritmia (Allessie *et al.*, 1984; Banville *et al.*, 1999; Vaidya *et al.* 1999; Nattel *et al.*, 2005).

Segundo Allessie *et al.* (1984), mais de um circuito reentrante pode se formar no átrio de cão durante a ocorrência de TA de origem colinérgica. Embora nossos resultados não permitam avaliar o número de tais circuitos, é possível supor que os vetoatriogramas determinados no presente estudo, dado seu alto grau de estabilidade e simetria, indiquem a ocorrência de apenas um circuito reentrante. Isto não causa surpresa, já que a área e volume de tecido atrial disponíveis para estabelecimento desses circuitos é bem mais limitada no rato do que no cão.

Por outro lado, os vetoatriogramas durante arritmias de origem β -adrenérgica em átrios esquerdos isolados (Boer & Bassani, 2004), apresentaram uma semelhança muito grande com os registros obtidos sob ritmo sinusal, e diferiram bastante daqueles obtidos durante a ocorrência de TA de origem colinérgica. Isso poderia ser explicado pela diferença de mecanismos responsáveis pelos dois tipos de arritmia. Há indicações de que arritmias atriais de origem β -adrenérgica estão associadas ao estabelecimento de focos ectópicos causados por correntes despolarizantes desenvolvidas devido à alta taxa de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático durante sobrecarga celular do íon (Nash *et al.*, 2001; Scoote & Williams, 2002; Bassani & Bassani, 2003; Zorn-Pauly *et al.*, 2004) e/ou à indução de automatismo em miócitos localizados nas veias pulmonares (Nattel *et al.*,

2005; Takahashi *et al.*, 2006). Isto implica no aparecimento funcional de um ou mais marca-passos num tecido que, em condições normais, é desprovido de automatismo. A regularidade dos intervalos entre contrações durante trens de atividade espontânea evocada por catecolaminas neste tecido (Boer & Bassani, 2004) sugere a existência de um marca-passo dominante (em oposição à geração de ectopismo multifocal), o que tornaria o átrio esquerdo funcionalmente semelhante ao direito. Nossa observação de grande semelhança de padrão dos vetoatriogramas direito sob ritmo sinusal e esquerdo durante arritmia adrenérgica está de acordo com esta proposta.

Uma decorrência importante do conjunto dessas observações é que nossos resultados indicam que a trajetória do VEM determinada pelo vetoatriograma é capaz de permitir a distinção dos padrões de propagação de arritmias cujo mecanismo dominante seja automatismo ectópico ou formação de circuitos reentrantes. A determinação do vetoatriograma, que é de implementação relativamente simples e dispensa o uso de arranjos de eletrodos para mapeamento elétrico do tecido, pode ser uma ferramenta experimental valiosa na identificação de mecanismos básicos envolvidos na geração de arritmias por fármacos e alterações físico-químicas do meio (e.g., composição iônica).

Para a compreensão dos possíveis mecanismos por meio dos quais a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos facilitaria a indução de TA por reentrância, devemos entender as conseqüências da ativação destes receptores. A ocupação dos receptores do subtipo m2 pela ACh liberada das terminações para-simpáticas durante a estimulação elétrica desencadeia uma cascata bioquímica que resulta em alteração da atividade elétrica celular. Entre estas alterações, destacam-se a redução da duração do PA e conseqüente abreviação do período refratário (Hoffman & Suckling, 1953; Boucher *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Sosunov *et al.*, 2002) e a redução na velocidade de condução do PA (Marques *et al.*, 1989). Como as terminações para-simpáticas não se encontram uniformemente distribuídas nos átrios (Hoover *et al.*, 2004), é de se esperar que estas alterações ocorram de maneira não homogênea no tecido, o que leva a aumento da anisotropia elétrica e da dispersão de refratariedade. Estes efeitos criam o substrato para o estabelecimento de circuitos reentrantes.

Um dos efeitos da estimulação de receptores muscarínicos do tipo m2 é a indução de uma corrente de fundo (*background*) retificadora de saída de K^+ , através de canais dependentes da ativação desses receptores. A indução desta corrente ($I_{K,ACh}$) é mediada pela interação dos canais de K^+ com a subunidade β da proteína ligante de GTP sensível a toxina pertússica (G_i), acoplada a receptores muscarínicos do subtipo m2, o que

promove a aberturas desses canais (Koumi *et al.*, 1997). Esta corrente, cujo efeito não depende de estimulação adrenérgica prévia, causa abreviação da fase de repolarização do PA e tem sido considerada o principal mecanismo envolvido no efeito direto da ACh em células atriais (McMorn *et al.*, 1993; Koumi *et al.*, 1997; Brodde & Michel, 1999; Zhang *et al.*, 2002). Em camundongos transgênicos deficientes das subunidades $\beta\gamma$ de G_i , ambos os efeitos cronotrópico e inotrópico da CCh estão ausentes no coração (Gehrmann *et al.*, 2002). A importância desta corrente para indução de TA de origem colinérgica é evidenciada pela completa abolição deste tipo de arritmia em camundongos com deficiência (*knockout*) do gene que codifica os canais de K^+ dependentes de ACh (Kovoor *et al.*, 2001). Também é importante observar que o amiodarone, que é capaz de bloquear $I_{K_{ACh}}$, abole a redução da duração do PA causada por ACh (Watanabe *et al.*, 1996) e suprime a indução de TA por estimulação de alta frequência em átrios isolados de rato (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2004). Portanto, a evidência disponível na literatura sustenta a hipótese de que o aumento da condutância de fundo da membrana ao K^+ , causado pela estimulação de receptores muscarínicos, desempenha um importante papel no favorecimento colinérgico da indução e manutenção de TA.

5.2 EFEITO PRÓ-ARRÍTMICO DA ABERTURA DE CANAIS DE K^+ DEPENDENTES DE ATP

Se, no caso da TA de origem colinérgica, a indução de $I_{K_{ACh}}$ tem sido considerada como o mecanismo subjacente ao encurtamento do período refratário e à facilitação de reentrância, seria plausível supor que a ativação tônica de uma corrente de saída de cátions pudesse mimetizar o efeito pró-arrítmico de agonistas colinérgicos. Para investigar esta possibilidade, e determinar se o encurtamento do PA pela ativação de corrente de K^+ é condição suficiente para facilitar a indução de TA, testamos o pinacidil, que atua sobre canais de K^+ regulados por ATP, causando sua abertura (Fan *et al.*, 1990; Uchida *et al.*, 1999; Kilbinger *et al.*, 2002; Tamargo *et al.*, 2004).

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP atuam como um elo entre V_m e o estado metabólico da célula. Estes canais permanecem fechados quando ligados ao ATP, mas, quando a concentração citosólica de ATP cai (como ocorre no caso de isquemia miocárdica), o nucleotídeo se dissocia do canal, e este se abre, deixando fluir uma

corrente de saída de K^+ ($I_{K,ATP}$), que, assim como $I_{K,ACh}$, apresenta retificação de saída (Snyders, 1999, Kane *et al.* 2005). Esta corrente de saída tende a causar hiperpolarização diastólica em células nodais (o que pode inibir o cronotropismo, Han *et al.*, 1996), e, por outro lado, reduz a duração do PA em células miocárdicas (Suzuki *et al.*, 2002). Este ajuste é particularmente importante durante a ocorrência de isquemia, na qual a disponibilidade de ATP encontra-se comprometida. A aceleração da repolarização pela ativação dos canais de K^+ sensíveis ao ATP reduz o influxo de Ca^{2+} (Kane *et al.*, 2005). Isto pode ter um papel importante não só para economia energética, mas também na atenuação da sobrecarga celular de Ca^{2+} nesta circunstância, pois mais de 70% dos fluxos de remoção deste íon do citosol dependem diretamente de ATPases (Bassani *et al.*, 1992). Assim, se o influxo for menor, menor será a carga celular de Ca^{2+} , e menos ATP será gasto no seu transporte.

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP apresentam grande semelhança estrutural com os canais que medeiam $I_{K,ACh}$. Além disso, ambos os canais possuem propriedade retificadora e sua abertura causa redução da duração do PA cardíaco (Snyders, 1999, Tamargo *et al.*, 2004).

Em nossos experimentos iniciais, a adição de pinacidil aumentou, de modo dependente da concentração, a incidência de TA durante a estimulação elétrica de alta frequência, como observamos previamente com o CCh (Zafalon *et al.*, 2004). Porém, havia a possibilidade de que este efeito pudesse ser devido à facilitação da liberação, pela estimulação elétrica, de ACh das terminações para-simpáticas presentes no átrio, embora houvesse relato prévio de inibição da liberação de ACh pelo pinacidil em átrio e intestino (Kilbinger *et al.*, 2002). Para esclarecer esta questão, repetimos os experimentos durante bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos por 1 μM atropina, concentração efetiva em abolir totalmente TA induzida por estimulação elétrica de alta frequência em átrios isolados (Godoy *et al.*, 1999; Zafalon *et al.*, 2004; presentes resultados). Observamos que, mesmo com os receptores muscarínicos bloqueados, o tratamento com pinacidil produziu um efeito arritmogênico significativo e dependente da concentração do fármaco, o que sugere um efeito direto do pinacidil sobre o tecido atrial.

Uma outra maneira de minimizar a possível contribuição da ACh liberada pela estimulação elétrica para o efeito arritmogênico do pinacidil foi testar seu efeito em átrios esquerdos, que são mais pobres em terminações para-simpáticas, quando comparados com os átrios direitos (Hoover *et al.*, 2004). Isto está de acordo com o baixo índice de indução de TA em átrios esquerdos, mesmo com o protocolo estimulatório mais eficiente

para indução em átrios direitos (Godoy *et al.*, 1999; presentes resultados), embora seja possível induzir TA de modo semelhante àquele em átrios direitos durante incubação com CCh (Godoy *et al.*, 1999). Isto indica que esta preparação, apesar de não possuir inervação colinérgica densa, é dotada de receptores colinérgicos muscarínicos capazes de mediar o efeito pró-arritmico colinérgico. Também em átrios esquerdos, observamos que pinacidil exerceu um efeito pró-arritmico significativo e, em ambas as preparações, este efeito foi revertido completamente após lavagem do fármaco.

Surpreendentemente, o pinacidil apresentou efeito antiarritmico quando aplicado em preparações pré-tratadas com CCh, portanto, já com facilitação da indução de TA. Uma possibilidade para explicar este efeito do pinacidil seria a promoção da liberação de catecolaminas (D'Alonzo *et al.*, 1998), as quais antagonizam o efeito pró-arritmico de agonistas colinérgicos muscarínicos (Zafalon *et al.*, 2004; presentes resultados). Porém, esta possibilidade parece improvável, já que seria esperado que as catecolaminas fossem mais efetivas em antagonizar a indução de TA durante estimulação colinérgica mais suave (liberação de ACh endógena pela estimulação elétrica) do que durante forte ativação de receptores muscarínicos pelo CCh exógeno, além da ACh endógena. Uma explicação tentativa seria que a soma dos efeitos do alto grau de estimulação muscarínica e do próprio pinacidil causaria uma redução generalizada da duração do PA por todo o tecido, de modo a reduzir a dispersão de refratariedade, o que criaria um substrato desfavorável para o estabelecimento de circuitos reentrantes. Outra possibilidade, mais atraente, seria a inibição recíproca das correntes mediada por canais retificadores de K^+ dependentes de ACh e de ATP, já descrita em miócitos atriais (Wellner-Kienitz *et al.*, 2004). Esta inibição recíproca foi atribuída pelos autores a alterações locais do potencial de equilíbrio do K^+ , originadas pela depleção do íon junto à face citosólica da membrana devido ao efluxo de K^+ decorrente da ativação inicial de um destes canais, o que resultaria em menor *driving force* para a corrente através do outro tipo de canal, ativado posteriormente. Assim, embora tenha efeito pró-arritmico independente, a ativação de I_{KATP} parece atuar atenuando o efeito pró-arritmico da ativação de $I_{K(ACh)}$.

Ao supormos que a abertura mantida de canais de K^+ seja o principal mecanismo envolvido na facilitação da indução de TA tanto por ACh/CCh, quanto por pinacidil, podemos esperar que a natureza da TA evocada pelo pinacidil seja a mesma daquela de origem colinérgica, ou seja, envolvendo propagação reentrante da atividade elétrica. Como mostrado no capítulo de Resultados, o vetoatriograma obtido durante TA evocada

na presença de pinacidiil em preparações pré-tratadas com atropina mostrou as mesmas características dos vetoatriogramas durante TA de origem colinérgica, especialmente a ausência de repouso elétrico, caracterizada por uma trajetória do VEM que nunca passa pelo ponto (0,0), o que é compatível com a formação de circuitos reentrantes.

Assim, os presentes resultados estão de acordo com a hipótese de que a abertura sustentada de canais de K^+ , tanto dependentes da ativação de receptores muscarínicos, quanto dependentes de ATP, é suficiente para facilitar o estabelecimento de reentrância e aumentar a predisposição à ocorrência TA, possivelmente por meio da aceleração da fase de repolarização do PA e abreviação do período refratário.

É interessante observar que estes resultados podem ter considerável importância clínica, pois eles são sugestivos de que a condição de isquemia aumenta a vulnerabilidade do tecido atrial à ocorrência de TA. Este mecanismo poderia contribuir, pelo menos em parte, para explicar a observação de Rastenyté & Jančaitytė (2005), de que a ocorrência de fibrilações e *flutters* atriais é mais freqüente em associação com infarto miocárdico do que com outro problema cardiovascular. No caso de tecido ventricular, isquemia miocárdica é reconhecidamente um forte fator de risco para o desenvolvimento de arritmias letais (Borger *et al.*, 2003).

5.3 PAPEL DE FOSFATASES NO ANTAGONISMO ADRENÉRGICO-COLINÉRGICO NA INDUÇÃO DE TA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA

Outro mecanismo, identificado previamente (Zafalon, 2001; Zafalon *et al.*, 2004), pelo qual a ativação de receptores muscarínicos poderia influenciar a vulnerabilidade atrial à TA parece envolver o controle dos níveis intracelulares de cAMP.

O cAMP, segundo mensageiro da cascata acoplada a receptores β -adrenérgicos, ativa a enzima PKA, a qual fosforila diversos substratos, entre eles, canais de Ca^{2+} do tipo L, presentes no sarcolema, o que leva a um aumento da sua probabilidade de abertura (Bers, 1991). Já a ocupação dos receptores colinérgicos muscarínicos por agonistas causa inibição da AC, por meio da interação com a subunidade α da proteína G, acoplada ao receptor m2, resultando em redução da taxa de síntese de cAMP. Portanto, esta via colinérgica causa indiretamente inibição da atividade dos canais de Ca^{2+} e da corrente que flui através destes canais (I_{CaL} , McDonald *et al.*, 1994). Deve-se ressaltar que a I_{CaL} é

uma corrente despolarizante, considerada de grande importância na determinação da duração do platô do PA cardíaco, e sua inibição resulta em encurtamento do PA (Bers, 1991; Opie, 1998).

Além do antagonismo no controle da síntese, uma outra maneira pela qual a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos poderia reduzir a concentração intracelular de cAMP envolve a estimulação da enzima fosfodiesterase do tipo 2 (Brodde & Michael, 1999; Endoh, 1999), a qual degrada cAMP em AMP. O bloqueio não seletivo de fosfodiesterases pelo IBMX, assim como a estimulação de receptores β -adrenérgicos pelo ISO e pela NA endógena, leva a uma redução de IT em átrios direitos isolados, o que demonstra que a acumulação de cAMP antagoniza o efeito pró-arritmico muscarínico. No entanto, este efeito pode ser totalmente revertido pela adição de agonista colinérgico muscarínico (Zafalon *et al.*, 2004; Zafalon, 2001; presentes resultados), o que indica a existência de outro mecanismo, que não a regulação da concentração intracelular de cAMP, pelo qual a via muscarínica antagoniza o efeito antiarritmico da acumulação do nucleotídeo, especialmente em condições de ativação da cascata de transdução β -adrenérgica.

Os receptores colinérgicos muscarínicos têm a capacidade de estimular a produção de cGMP via estimulação da enzima NO-sintase (enzima que catalisa a conversão de L-arginina em NO) (Brodde & Michel, 1999; Endoh, 1999). Este segundo mensageiro tem sido implicado na reversão, pelo CCh, do aumento de I_{CaL} causado por inibição de fosfodiesterases em miócitos cardíacos (Mubagwa *et al.*, 1993). O cGMP pode estimular fosfatases, possivelmente envolvendo fosforilação destas pela quinase dependente de cGMP (PKG, Sperelakis, 1994; Brodde & Michel, 1999). Este mecanismo, portanto, poderia atenuar os efeitos da estimulação da PKA por cAMP, reduzindo o estado de fosforilação dos substratos desta quinase. Foi demonstrado o envolvimento de fosfatases na redução de I_{CaL} e da força de contração por ACh no coração (Herzig *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1995; Neumann & Scholz, 1998; Sakai *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2003). Portanto, em tese, a estimulação de fosfatases seria uma possibilidade para explicar a restauração de IT pelo CCh em condições de aumento da concentração de cAMP intracelular.

Para testar o envolvimento de fosfatases no antagonismo exercido pela estimulação muscarínica sobre o efeito antiarritmico da acumulação de cAMP, utilizamos NaF, um inibidor não seletivo de fosfatases, efetivo na inibição de desfosforilação enzimática e na atenuação de efeitos evocados pela estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos

m2 e na inibição da (Neumann *et al.*, 1995). Embora seja conhecida a ação do fluoreto em ativar proteínas ligantes de GTP (Bigay *et al.*, 1985), a concentração utilizada neste trabalho (3 mM) parece ser insuficiente para evocar este efeito, já que não causa alteração da concentração intracelular de cAMP (Neumann *et al.*, 1995). Além disso, observamos que 3 mM NaF não afetou significativamente o cronotropismo atrial, que é bastante sensível à ativação de vias acopladas a proteínas G.

Nossa observação que NaF suprimiu a restauração de IT por CCh em preparações pré-tratadas com ISO e IBMX representa uma evidência a favor da hipótese de que a ativação muscarínica de fosfatases teria um papel no antagonismo colinérgico-adrenérgico na determinação da susceptibilidade a TA, mais especificamente em condições de alta atividade da PKA.

Uma conclusão possível do conjunto de resultados até agora obtidos seria que o efeito antiarrítmico da estimulação da via β -adrenérgica, em antagonismo com a via muscarínica, envolveria o aumento de fosforilação de proteínas, possivelmente pela PKA. Embora não tenhamos evidência direta desta hipótese, ela encontra suporte nas observações de que tanto o aumento da acumulação intracelular de cAMP, quanto a inibição de fosfatases, é capaz de antagonizar os efeitos pró-arrítmicos da ACh e do CCh. No entanto, não podemos descartar o envolvimento de outras quinases cujas atividades possam estar aumentadas durante a estimulação β -adrenérgica. É possível que os substratos alvos da PKA (e/ou outras quinases) e da fosfatase cuja atividade parece ser aumentada pela estimulação muscarínica sejam proteínas, cuja função influencie na duração do PA (e.g., canais iônicos e transportadores iônicos eletrogênicos). É interessante observar que a estimulação de adrenoreceptores β , apesar de diminuir a duração do PA atrial, tem o efeito de suprimir o encurtamento do PA causado pela estimulação muscarínica (Sosunov *et al.*, 2002).

5.4 PROPOSTA DE MECANISMOS RELEVANTES NA DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ATRIAL A TAQUIARRITMIA POR ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA FREQUÊNCIA

A Figura 5.2 apresenta um resumo esquemático da nossa proposta de mecanismos celulares envolvidos na arritmogênese por estimulação atrial de alta frequência, que é dependente da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos, e de seu antagonismo

pela estimulação da via β -adrenérgica. Como podemos observar, a ação dos agonistas de receptores muscarínicos m2 e β -adrenérgicos converge, por meio de acoplamento com proteínas ligantes de GTP, para o controle da atividade da enzima adenilato-ciclase (AC) que converte ATP em cAMP, e cuja atividade é estimulada (+) ou inibida (-) pela ocupação de receptores β -adrenérgicos ou muscarínicos, respectivamente. O cAMP, por sua vez, ativa a PKA, por promover a dissociação de suas subunidades catalítica e regulatória.

Figura 5.2 - Resumo esquemático dos mecanismos celulares envolvidos na arritmogênese muscarínica em tecido atrial e de seu antagonismo pela estimulação da via β -adrenérgica.

regulação da concentração de cAMP, embora não permitam a distinção entre os mecanismos (a) e (b). Os resultados do presente estudo, por outro lado, apontam um papel do último mecanismo neste antagonismo.

Independentemente das vias de sinalização que regulam a concentração de cAMP, a abertura de canais de K^+ , disparada diretamente pela ocupação dos receptores muscarínicos e translocação da subunidade β de G_i , implica no surgimento de uma corrente hiperpolarizante de fundo, que acelera a repolarização e a recuperação da refratariedade nas regiões do tecido de maior densidade de receptores $m2$ e/ou desses canais. A maior dispersão de refratariedade resultante facilitaria reentrância na propagação de atividade elétrica disparada por estímulos prematuros (providos pela estimulação elétrica, neste modelo experimental).

Assim, a estimulação elétrica de ambos os tipos celulares, miocárdico atrial e neurônios para-simpáticos, estaria envolvida na geração e manutenção de TA. A primeira forneceria o gatilho (estímulo prematuro), e a segunda, por meio da liberação de ACh e conseqüente redução da refratariedade elétrica atrial, forneceria o substrato para a reentrância da atividade elétrica. A observação de que a indução de TA não ocorre durante a estimulação elétrica de preparações tratadas com bloqueador muscarínico, ou em átrios expostos a altas concentrações de agonista muscarínico exógeno, mas não estimulados eletricamente (Godoy *et al.*, 1999; presentes resultados), confirma que a estimulação elétrica atua em alvos miocárdico e neural para a indução de TA. Os resultados dos experimentos com pinacidil neste trabalho mostram, pela primeira vez, que é possível induzir TA neste modelo sem a participação de estimulação de receptores colinérgicos, porém, desde que se mimetize o efeito desta estimulação sobre a refratariedade. Estes achados são sugestivos de que o aumento da condutância de fundo ao K^+ , dependente ou não da ativação da via muscarínica, seja condição necessária e suficiente para facilitação da indução e manutenção de TA.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

- Aidley DJ. *The Physiology of Excitable Cells*. 3ª ed. Cambridge University Press. The Edinburgh Building, Cambridge, UK. 1990, 520 p.
- Allessie MA, Lammers WJEP, Bonke IM, Hollen J. Intra-atrial reentry as a mechanism for atrial flutter induced by acetylcholine and rapid pacing in the dog. *Circulation*, 70: 123-135, 1984.
- Allessie MA; Boyden PA; Camm AJ; Kléber AG; Lab MJ; Legato MJ; Rosen MR; Schwartz PJ; Spooner PM; Van Wagoner DR; Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation*, 103: 769-777, 2001.
- Banville I, Gray RA, Ideker RE, Smith WM. Shock-induced figure-of-eight reentry in the isolated rabbit heart. *Circ Res*, 85: 742-752, 1999.
- Bassani RA. Transient outward potassium current and Ca^{2+} homeostasis in the heart: beyond the action potential. *Braz J Med Biol Res*, 39: 393-403, 2006.
- Bassani, RA, Bassani, JWM. Papel do Ca^{2+} na geração de arritmias cardíacas: quando a hierarquia é subvertida. *Rev Cardiol Est São Paulo*, 13: 693-706, 2003.
- Bassani RA, Bassani JWM, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractions. *J Physiol* 453: 591-608, 1992.
- Berne RM. & Levy MN. *Princípios de Fisiologia*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1991. 829 p.
- Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. 335 p.
- Bethke T, Meyer W, Schmitz W, Scholz H, Stein B, Thomas K, Wenzlaff H. Phosphodiesterase inhibition in ventricular cardiomyocytes from guinea-pig hearts. *Br J Pharmacol*, 107: 127-133, 1992.
- Bian W, Tung L. Structure-related initiation of reentry by rapid pacing in monolayers of cardiac cells. *Circ Res* 98: e29-e38, 2006.
- Bigay J, Philippe D, Pfister C, Chadre M. Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the c-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett*, 191: 181-185, 1985.
- Boer DC, Bassani RA. Quantitation of the dose-response relationship for arrhythmogenic agents in isolated cardiac tissue. *Rev Bras Eng. Biomed*, 20: 3-10, 2004.
- Boldrini JL, Costa SIR, Figueiredo VL, Wetzler HG. *Álgebra Linear*, 3a. ed. Harbra Ltda. São Paulo, SP. 1980. 411 p.
- Boucher M, Chassaing C, Chapuy E, Lorente P. Hysteresis in atrial refractoriness in the conscious dog: influence of stimulation parameters and control by the autonomic nervous system. *J Cardiovasc Pharmacol*, 28: 842-847, 1996.
- Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*, 51: 651-689, 1999.

Bursac N, Tung L. Acceleration of functional reentry by rapid pacing in anisotropic cardiac monolayers: formation of multi-wave functional reentries. *Cardiovasc Res*, 69: 381-390, 2006.

Chu L, Norota I, Ishii K, Endoh M. Inhibitory action of the phosphatase inhibitor cantharidin on the endothelin-1-induced and the carbachol-induced negative inotropic effect in the canine ventricular myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 41: S89-S92, 2003.

D'Alonzo AJ, Zhu JL, Darbenzio RB, Dorso CR, Grover GJ. Proarrhythmic effects of pinacidil are partially mediated through enhancement of catecholamine release in isolated perfused guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 30: 415-423, 1998.

Endoh M. Muscarinic regulation of Ca^{2+} signaling in mammalian atrial and ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol*, 375:177-96, 1999.

England PJ. Studies on the phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin during modification of contraction in perfused rat heart. *Biochem J*, 160: 295-304, 1976.

Euler DE, Olshansky B, Kim SY. Reflex vagal control of atrial repolarization. *Am J Physiol*, 271: H870-H875, 1996.

Euler DE, Scanlon PJ. Acetylcholine release by a stimulus train lowers atrial fibrillation threshold. *Am J Physiol*, 253: H863-H868, 1987.

Fan Z, Nakayama K, Hiraoka M. Pinacidil activates the ATP-sensitive K^{+} channel in inside-out and cell-attached patch membranes of guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, 415: 387-394, 1990.

Gehrmann J, Meister M, Maguire CT, Martins DC, Hammer PE, Neer EJ, Berul CI, Mende U. Impaired parasympathetic heart rate control in mice with a reduction of functional G protein betagamma-subunits. *Am J Physiol* 282: H445-H456, 2002.

Godoy CMG, Bassani JWM, Ferreira HM, Silva MLM. A microcomputer-based system for programmed electrical stimulation. *IV International Symposium on Biomedical Engineering*, Peñíscola, Espanha. Anais, p. 221-222, 1991.

Godoy CMG, Bassani RA, Bassani JWM. Role of acetylcholine in electrical stimulation-induced arrhythmia in rat isolated atria. *J Cardiovasc Pharmacol*, 34: 475-479, 1999.

Griffiths, DJ. *Introduction to Electrodynamics*. 3ª ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, EUA. 1999. 576 p.

Guyton, AC & Hall, JE. Coração. Em: *Fisiologia Humana*. Guyton, AC (ed). 10ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002. 973 p

Han X, Light PE, Giles WR, French RJ. Identification and properties of an ATP-sensitive K^{+} current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol*, 490: 337-350, 1996.

- Herzig S, Meier A, Pfeiffer M, Neumann J. Stimulation of protein phosphatases as a mechanism of the muscarinic-receptor-mediated inhibition of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Pflügers Arch*, 429: 531-538, 1995.
- Hirose M, Furukawa Y, Nagashima Y, Yamazaki K, Hoyano Y, Chiba S. Effects of PACAP-38 on the SA nodal pacemaker activity in autonomically decentralized hearts of anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 29: 216-21, 1997.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544, 1952.
- Hoffman BF, Rosen MR. Cellular mechanisms for cardiac arrhythmias. *Circ Res*, 49: 1-15, 1981.
- Hoffman BF, Suckling EE. Cardiac cellular potentials: effect of vagal stimulation and acetylcholine. *Am J Physiol*, 173: 312-20, 1953.
- Hoover DB, Ganote CE, Ferguson SM, Blakely RD, Parsons RL. Localization of cholinergic innervation in guinea pig heart by immunohistochemistry for high-affinity choline transporters. *Cardiovasc Res*, 62: 112-121, 2004.
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*, 54: 204-216, 2002.
- Jurevicius J, Fischmeister R. cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca^{2+} channels by β -adrenergic agonists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 295-299, 1996.
- Kane GC, Liu XK, Yamada S, Olson TM, Terzic A. Cardiac K_{ATP} channels in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*, 38: 937-943, 2005.
- Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing condition for atrial fibrillation. *Am J Cardiol*, 82: 2N-9N, 1998.
- Katz AM. Cardiac ion channels. *N Engl J Med*, 328:1244-51, 1993.
- Kilbinger H, Krause A, Mang CF, Englert H, Wirth K. Effects of K_{ATP} channel modulators on acetylcholine from guinea-pig isolated atria and small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 365: 371-377, 2002.
- Kim KB, Rodefeld MD, Schuessler RB, Cox JL, Boineau JP. Relationship between local atrial fibrillation interval and refractory period in the isolated canine atrium. *Circulation*, 94: 2961-2967, 1996.
- Kneller J, Zou R, Vigmond EJ, Wang Z, Leon J, Nattel S. Cholinergic atrial fibrillation in a computer model of a two-dimensional sheet of canine atrial cells with realistic ionic properties. *Circ Res*, 90: e73-e87, 2002.
- Koumi S, Sato R, Nagasawa K, Hayakawa H. Activation of inwardly rectifying potassium channels by muscarinic receptor-linked G protein in isolated human ventricular myocytes. *J Membr Biol* 157: 71-81, 1997.

- Kovoor P, Wickman K, Maguire CT, Gehrman J, Berul CI, Clapham DE. Evaluation of the role of $I_{(KACH)}$ in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 37: 2136-2143, 2001.
- Lin HJ, Wolf PA, Hayes MK, Beiser AS, Kase CS, Benjamin EJ, D'Agostino RB. Stroke severity in atrial fibrillation - the Framingham study. *Stroke*, 27: 1760-1764, 1996.
- Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol*, 273:H805-H816, 1997.
- Lopes RO, Okada T, Nani E, Novaes DZ, Loyola LH, Martins SL, Garcia C, Barata CA, Nunes E, Belém L, Rabischoffsky A, Rioli RS, Martins JA, Nascimento FJ, Farias A, Fernandes LCM. Programação do marca-passo multissítio com ajuda de ECG de superfície. *Rev Soc Cardiol Est Rio de Janeiro*, 19: 177-179, 2006.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microreentrant source as a mechanism of atrial fibrillation in isolated sheep heart. *Circulation*, 101: 194-199, 2000.
- Marques JLB. *Metodologia e Instrumentação para Determinação do Tempo de Recuperação do Nódulo Sinusal in Vitro*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Elétrica, UNICAMP, 1989, 70 p.
- McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle. *Physiol Rev*, 74: 365-507, 1994.
- McMorn SO, Harrison SM, Zang W, Yu X, Boyett MR. A direct inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 265: H1393-H1400, 1993.
- Minamino T, Kitakase M, Asanuma H, Ueda Y, Koretsune Y, Kuzuya T, Hori M. Plasma adenosine levels and platelet activation in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*, 83: 194-198, 1999.
- Moreira DAR. *Efeitos da estimulação com corrente elétrica contínua pulsátil sobre as propriedades eletrofisiológicas atriais: estudo experimental da fibrilação atrial em cães*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002.
- Mori K, Hara Y, Saito T, Masuda Y, Nakaya H. Anticholinergic effects of class III antiarrhythmic drugs in guinea-pig atrial cells: different molecular mechanisms. *Circulation*, 91: 2834-2843, 1995.
- Mubagwa K, Shirayama T, Moreau M, Pappano AJ. Effects of PDE inhibitors and carbachol on the L-type Ca current in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 264: H1353-H1363, 1993.
- Nash MP, Thornton JM, Sears CE, Varghese A, O'Neill M, Paterson DJ. Ventricular activation during sympathetic imbalance and its computational reconstruction. *J Appl Physiol*, 90: 287-298, 2001.
- Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Progr Cardiovasc Dis*, 48: 9-28, 2005.

Netter FH. *The Ciba Collection of Medical Illustrations: Heart*. vol. 5, 4^a ed. Summit, EUA, 1978.

Neumann J, Kaspereit G, Kirschhefer U, Scholz H. Sodium fluoride attenuates the negative inotropic effects of muscarinic M2 and adenosine receptor agonists. *Eur J Pharmacol*, 294: 451-457, 1995.

Neumann J, Scholz H. Deferoxamine blocks interaction of fluoride and carbachol in isolated mammalian cardiac preparations. *Eur J Pharmacol*, 350: 189-194, 1998.

Obel OA, Luddington L, Maarouf N, Aytemir K, Ekwali C, Malik M, Camm AJ. Effects of ventricular rate and regularity on the velocity and magnitude of left atrial appendage flow in atrial fibrillation. *Heart*, 91: 764-8, 2005.

Okuno E, Caldas IL, Chow C. *Física para Ciências Biológicas e Biomédicas*. 1^a ed. Harper & Row do Brasil. São Paulo, SP. 490 p.

Opie LH. *The Heart: Physiology from Cell to Circulation*. 3^o ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publ., 1998. 637 p.

Pipberger HV, Carter TN. Analysis of the normal and abnormal vectorcardiogram in its own reference frame. *Circulation*, 25: 827-840, 1962.

Prystowsky EN, Benson, Jr, DW, Fuster V, Hart RG, Kay GN, Myerburg RJ, Naccarelli GV, Wyse DG. Management of patients with atrial fibrillation. *Circulation*, 93: 1262-1277, 1996.

Rastenytė D, Jančaitytė L. Sex differences in one-year mortality after a first-ever myocardial infarction. *Medicina (Kaunas)* 41: 754-759, 2005.

Rawlings CA. *Electrocardiography*. Redmond, Washington. SpaceLabs Inc., 1991. 129 p.

Roden DM. Antiarrhythmic drugs. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman-Gilman A (eds.). 9^a ed. New York, McGraw-Hill, 1996, pp. 839-874.

Sakai R, Shen JB, Pappano AJ. Elevated cAMP suppresses muscarinic inhibition of L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*, 34: 304-315, 1999.

Scoote M, William AJ. The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. *Cardiovasc Res*, 56: 359-372, 2002.

Seidl K, Hauer B, Schwick NG, Zellner D, Zahn R, Senges J. Risk of thromboembolic events in patients with atrial flutter. *Am J Cardiol*, 82: 580-583, 1998.

Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Progr Biophys Mol Biol*, 81: 133-76, 2003.

- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*, 42: 377-90, 1999.
- Sperelakis N. Regulation of calcium slow channels of heart by cyclic nucleotides and effects of ischemia. *Adv Pharmacol*, 31: 1-24, 1994.
- Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR. Adrenergic-cholinergic interaction that modulates repolarization in the atrium is altered with aging. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13: 374-379, 2002.
- Sperelakis N, Banks RO. *Physiology*. Little Brown & Co., Boston, USA, 1993. 911p.
- Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marbán E, Nakaya H. Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*, 109: 509-16, 2002.
- Takahashi Y, Hocini M, O'Neill MD, Sanders P, Rotter M, Rostock T, Jonsson A, Sacher F, Clementy J, Jais P, Haissaguerre M. Sites of focal activity characterized by endocardial mapping during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, 16: 2005-2012, 2006.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*, 62: 9-33, 2004.
- Tomita T, Takei M, Saikawa Y, Hanaoka T, Uchikawa SI, Tsutsui H, Aruga M, Miyashita T, Yazaki Y, Imamura H, Kinoshita O, Owa M, Kubo K. Role of autonomic tone in the initiation and termination of paroxysmal atrial fibrillation in patients without structural heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 14: 559-564, 2003.
- Uchida T, Yashima M, Gotoh M, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen PS, Karagueuzian HS. Mechanism of acceleration of functional reentry in the ventricle - effects of ATP-sensitive potassium channel opener. *Circulation*, 99: 704-712, 1999.
- Ukani ZU, Ezekowitz MD. Contemporary management of atrial fibrillation. *Med Clin North America*, 79: 1135-1152, 1995.
- Vaidya D, Morley GE, Samie FH, Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart: a challenge to critical mass hypothesis. *Circ Res*, 85: 174-181, 1999.
- Waldo AL. Mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation: distinct entities or two sides of a coin? *Cardiovasc Res*, 54: 217-29, 2002.
- Wang YG, Hüser J, Blatter LA, Lipsius SL. Withdrawal of acetylcholine elicits Ca^{2+} -induced delayed afterdepolarizations in cat atrial myocytes. *Circulation*, 96: 1275-1281, 1997.
- Watanabe Y, Hara Y, Tamagawa M, Nakaya H. Inhibitory effect of amlodarone on the muscarinic acetylcholine receptor-operated potassium current in guinea pig atrial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 279: 617-624, 1996.

Wellner-Kienitz M, Bender K, Rinne A, Pott L. Voltage-dependence of ATP-dependent K⁺ current in rat cardiac myocytes is affected by I_{K1} and I_{K(ACh)}. *J Physiol* 561: 459-469, 2004.

Weiss TF. *Cellular Biophysics, Vol.2: Electrical Properties*. The MIT Press, Cambridge, MT, 1997. 450p.

Yusuf S, Camm JA. The sinus tachycardias. *Natl Clin Pract Cardiovasc Med*, 2: 44-52, 2005.

Zafalon Jr N. *Taquiarritmia Induzida por Estimulação Elétrica em Átrios Isolados de Ratos: Estudo de Protocolos Estimulatórios e Mecanismos Celulares*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

Zafalon Jr N, Bassani JWM, Bassani RA. Adrenergic-cholinergic antagonism in atrial fibrillation induced by electrical stimulation. *Rev Fed Argentina Cardiol*, 30 (suppl 1): 35, 2001.

Zafalon Jr N, Bassani JWM, Bassani RA. Cholinergic-adrenergic antagonism in the induction of tachycardia by electrical stimulation in isolated rat atria. *J Mol Cell Cardiol*, 37: 127-135, 2004.

Zhang H, Holden AV, Noble D, Boyett MR. Analysis of the chronotropic effect of acetylcholine on sinoatrial node cells. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 13: 465-474, 2002.

Zorn-Pauly K, Schaffer P, Pelzmann B, Lang P, Mächler H, Rigler B, Koidl B. I_f in left human atrium: a potential contributor to ectopy. *Cardiovasc Res*, 64: 250-259, 2004.