

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

TÍTULO: METODOLOGIA E INSTRUMENTAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO
DO TEMPO DE RECUPERAÇÃO DO NÓDULO SINUSAL
IN VITRO.

AUTOR: Jefferson Luiz Brum Marques

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani

*Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida por Jefferson Luiz Brum Marques e aprovada
pela Comissão Julgadora em 27/11/89.*



Campinas, São Paulo, 1989.

"O Cientista não se distingue por aquilo em que acredita, mas pela maneira e pelo motivo de sua crença. Suas crenças não são baseadas na autoridade ou na intuição, mas sim nas evidências."

Karl Kautsky
1854-1938

Dedico este trabalho aos
meus queridos Pais e
Irmãos, pelo carinho e
incentivo; e

para Claudia Mirian de
Godoy, pela sua certeza
de que algum dia seremos
plenamente felizes.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer às pessoas que muito contribuíram para minha formação nestes últimos três anos, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani, cujos ensinamentos, orientação, incentivo e amizade foram decisivos para realização deste trabalho.

Quero agradecer também, aos Profs. do Departamento de Engenharia Biomédica; aos técnicos do laboratório de Engenharia Médica e Bioengenharia; aos colegas e amigos do Centro de Engenharia Biomédica pelo apoio e amizade, e que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho. Cabe ainda um agradecimento à Dra. Rosana Almada Bassani pelos ensinamentos, colaboração e incentivo, os quais foram de grande valia.

Agradecimentos ao CNPq e CAPES pela concessão de bolsas de estudos, e ao FAP/UNICAMP pelo financiamento do instrumento desenvolvido neste trabalho.

RESUMO

Disfunções do marca-passo natural do coração, o nóculo sinusal, tem sido avaliadas pela medição do tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS), que corresponde ao intervalo antes da próxima atividade sinusal espontânea, após a estimulação elétrica atrial.

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia e um sistema de instrumentação para determinação do TRNS e do TRNS corrigido ($TRNSc = TRNS$ menos o intervalo espontâneo médio, IEM) *in vitro*. A metodologia consiste da preparação do átrio direito isolado de rato e a instrumentação é constituída por uma unidade isolada de captação/estimulação conectada a um microcomputador dedicado. Com isto pode-se efetuar a captação, amplificação, filtragem e processamento do sinal correspondente à atividade elétrica atrial, possibilitando a determinação do TRNS a partir dos métodos da estimulação atrial contínua (EAC) e da estimulação atrial com pulsos prematuros (EAP), os quais são frequentemente utilizados clinicamente. Como aplicação, valores de TRNS foram determinados a partir dos métodos da EAC e EAP, e comparados em diversas condições experimentais. Observou-se que o aumento da concentração extracelular de potássio aumentou significativamente ($P < 0,05$) o TRNS e $TRNSc$, e que, embora ambos, a noradrenalina e a acetilcolina, tenham afetado significativamente o IEM e o TRNS ($P < 0,05$), apenas na presença de acetilcolina foi encontrada correlação significativa ($P < 0,05$) entre $TRNSc$ e IEM. Os métodos da EAC e EAP produziram resultados diferentes, exceto em intervalos de estimulação próximos ao IEM.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a metodologia e instrumentação desenvolvidas podem ser utilizadas para explorar as características dos métodos existentes para determinação do TRNS, além de possibilitar a intensificação dos estudos para o desenvolvimento de novos métodos para avaliação da função do nóculo sinusal.

ABSTRACT

Dysfunctions of the Sinus Node have been evaluated by measurement of the sinus node recovery time (SNRT), which is the interval before resumption of the sinus node activity, after atrial electrical stimulation.

In the present work, it was developed a methodology and an instrumentation system for the *in vitro* SNRT and corrected SNRT (CSNRT = SNRT minus mean spontaneous cycle length, MCL) determination. The methodology consists of the isolated rat right atrium preparation and an instrumentation system composed of an isolated sensing/stimulation unit connected to a dedicated microcomputer. The instrumentation allows the sensing, amplification, filtering and processing of the signal corresponding to the electrical atrial activity, permitting SNRT determination by two methods, the continuous pacing method (CP) and the method of stimulation with premature pulses (PP), that are currently used for clinical SNRT determination. As an application, the values of SNRT obtained by CP and PP, were compared in several experimental conditions. It was observed that the SNRT and CSNRT increased significantly ($P < 0.05$) in high extracellular potassium concentration, and that, although both norepinephrine and acetylcholine affected the MCL and SNRT ($P < 0.05$), only in the presence of acetylcholine the CSNRT was significantly ($P < 0.05$) correlated to MCL. The SNRT values obtained by CP and PP were different, except for the stimulation intervals near the MCL.

The results obtained clearly show that the methodology and instrumentation developed may be used to explore the characteristics of the methods used for SNRT determination and to improve the studies with animal preparations concerning environmental influences on the SNRT, as well as the development of new stimulatory procedures for sinus node function evaluation.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice.....	iii, iii'
 1. INTRODUÇÃO.....	 01
1.1 O marca-passo cardíaco (nódulo sinusal).....	06
1.2 Patologias do nódulo sinusal.....	12
1.3 Testes para avaliação da função do nódulo sinusal....	13
1.3.1 Monitoração contínua do Eletrocardiograma por períodos prolongados ("Holter").....	14
1.3.2 Resposta ao esforço físico.....	14
1.3.3 Estimulação do seio carotídeo.....	15
1.3.4 Manobra de Valsalva.....	16
1.3.5 Testes farmacológicos.....	16
1.3.6 Exame eletrofisiológico.....	18
1.4 Objetivos.....	23
 2. MATERIAIS E MÉTODOS	
2.1 Animais.....	24
2.2 Produtos químicos.....	24
2.3 Soluções fisiológicas.....	25
2.4 Metodologia e instrumentação desenvolvidas	
2.4.1 Preparação biológica e registros típicos.....	26
2.4.2 Modelo teórico para determinação do TRNS.....	29
2.4.3 Instrumentação.....	37
2.4.3.1 "Hardware".....	37
2.4.3.2 "Software".....	42
2.4.3.3 Operação.....	44

2.5	Protocolos experimentais.....	49
2.5.1	Comparação dos métodos para determinação do TRNS.....	49
2.5.2	Influência dos parâmetros estimulatórios sobre o TRNS.....	50
2.5.3	Influência do bloqueio de receptores sobre o TRNS.....	50
2.5.4	Efeito da $[KCl]_O$ sobre o TRNS.....	51
2.5.5	Efeito dos neurotransmissores sobre o TRNS....	51
2.6	Análise estatística.....	53
3. RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA		
3.1	Comparação dos métodos para determinação do TRNS.....	54
3.2	Influência dos parâmetros estimulatórios sobre o TRNS.....	57
3.3	Influência do bloqueio de receptores sobre o TRNS....	59
3.4	Efeito da $[KCl]_O$ sobre o TRNS.....	61
3.5	Efeito dos neurotransmissores sobre o TRNS.....	64
4.	DISCUSSÃO.....	70
5.	CONCLUSÕES.....	79
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
7.	APÊNDICE.....	89

1. INTRODUÇÃO

O coração é um órgão muscular composto por quatro câmaras: duas superiores, os átrios direito e esquerdo, e duas inferiores, os ventrículos direito e esquerdo (Figura 1.1). A função do coração é manter a circulação de modo que um suprimento adequado de sangue sob pressão suficiente seja distribuído a todos os tecidos do corpo. Deste modo, sua atividade mecânica, composta por contrações rítmicas dos átrios seguidas pelas dos ventrículos, constitui-se em fator permissivo para a circulação do sangue através de todo o organismo (Milnor, 1980).

A atividade mecânica do coração, deflagrada pela despolarização da membrana das células miocárdicas depende de três propriedades fisiológicas básicas do músculo cardíaco - auto-ritmicidade, condutibilidade e contratilidade. No coração normal, estas propriedades estão desenvolvidas em graus diferentes nas várias regiões da musculatura cardíaca, mas encontram-se fortemente relacionadas, conferindo uma vigorosa organização espaço-temporal à sua contração.

A sequência de excitação do coração é apresentada na Figura 1.2. A despolarização iniciada no nóculo sinusal (NS) espalha-se radialmente através dos átrios, convergindo sobre o nóculo atrio-ventricular (NAV) e completando-se em cerca de 0,1s. Devido à lenta condução elétrica através do NAV, ocorre um atraso de aproximadamente 0,1 s antes da onda de excitação difundir-se

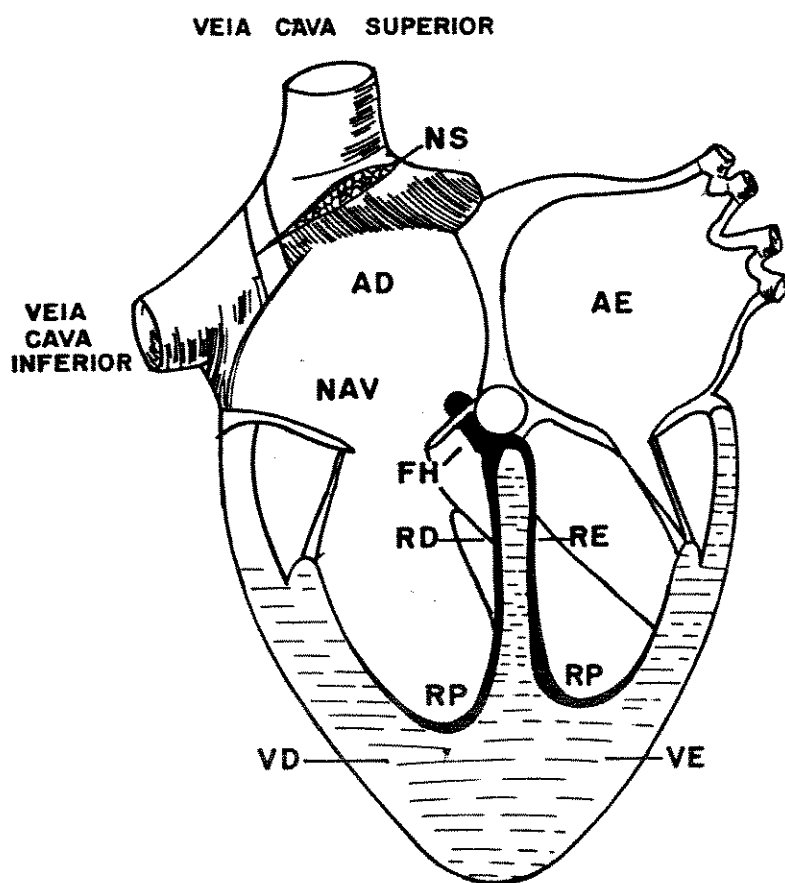


Figura 1.1 - Desenho esquemático do coração humano. NS, nódulo sinusal; AD e AE, átrios direito e esquerdo, respectivamente; NAV, nódulo átrio-ventricular; FH, feixe de His; RD e RE, ramos direito e esquerdo do feixe de His, respectivamente; VD e VE, ventrículos direito e esquerdo, respectivamente; RP, ramificações da rede de Purkinje nos ventrículos direito e esquerdo. (modificado de Milnor, 1980).

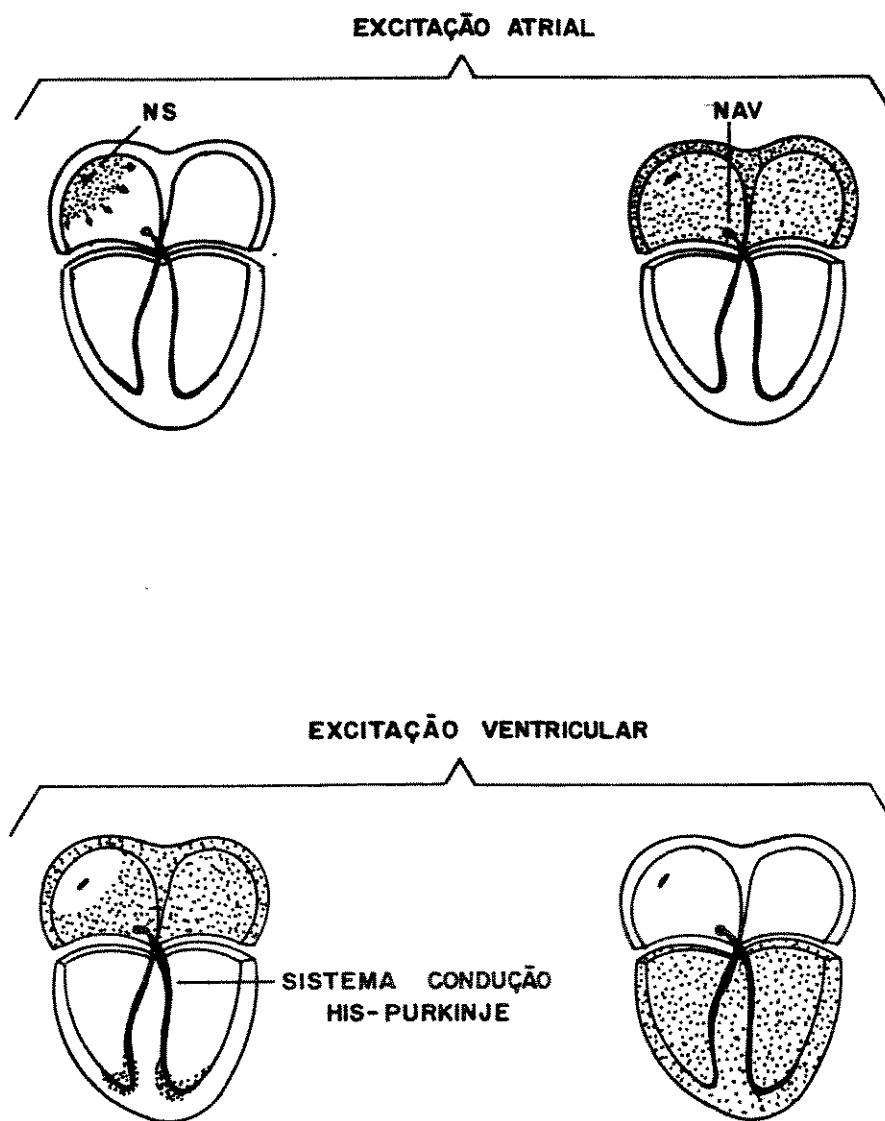


Figura 1.2 - Sequência de excitação do coração. NS, nódulo sinusal; NAV, nódulo átrio-ventricular. (modificado de Vander et al., 1980).

pelos ventrículos. O NAV e o feixe de fibras que dele se originam constituem a única ligação elétrica entre os átrios e os ventrículos, sendo as demais áreas de contato separadas por tecido conjuntivo não condutor. Após deixar o NAV, a ativação elétrica orienta-se rapidamente por fibras miocárdicas especializadas, o sistema de condução His-Purkinje, que descem pelo septo interventricular como feixes que se espalham por quase todo miocárdio ventricular direito e esquerdo. Estas fibras finalmente entram em contato com as fibras miocárdicas ordinárias, através das quais a ativação elétrica é transmitida célula-a-célula ao restante do coração. A rápida condução pelas fibras de Purkinje, que se distribuem de maneira altamente difusa no miocárdio, ocasiona despolarização maciça dos ventrículos direito e esquerdo mais ou menos simultaneamente e asseguram uma contração isolada, coordenada e síncrona (Ganong, 1969; Vander et al., 1980).

O coração normal, munido de suas propriedades básicas e sob controle modulatório do sistema nervoso autonômico, efetua seu trabalho contraindo-se em média 80 vezes por minuto, podendo bombear cerca de 10.000 litros de sangue por dia, em um indivíduo normal de vida sedentária.

Infelizmente, inúmeras patologias como a endocardite, a febre reumática, doenças vasculares, doença de Chagas ou intoxicação por drogas e traumas cirúrgicos podem comprometer seriamente a função bombeadora do coração

(Bashour, 1985), fazendo com que a doença cardíaca ocupe os primeiros lugares no número de mortes de indivíduos ainda em plena atividade física e mental. Por outro lado, com o advento das técnicas cirúrgicas modernas (e.g. cirurgias de revascularização miocárdica, substituição de válvulas) e dos sofisticados modelos atuais de marca-passos cardíacos artificiais, uma parcela significativa de pessoas tornadas incapacitadas pela doença tem recuperado parcialmente sua atividade normal.

Dentre as diferentes doenças do coração, aquelas que acabam por levar ao implante de marca-passo artificial apresentam grande incidência, sendo que as afecções dos sistemas gerador e controlador da atividade cardíaca (marca-passo natural e seu sistema de irrigação, e tecido nervoso adjacente) aparecem com destaque significativo. Nos Estados Unidos, cerca de 52% dos implantes se devem a disfunção do marca-passo natural do coração (Tonkin & Heddle, 1984; Cain, 1987; Yee & Strauss, 1987). Embora se desconheça a existência de dados semelhantes no Brasil, é bem provável que este número seja ainda maior, uma vez que doenças de origem infecciosa, uma das principais causas da disfunção do marca-passo natural (Chung, 1978; James, 1981), tendem a ser mais frequentes nos países menos desenvolvidos.

O sucesso do implante de marca-passo artificial depende, entre outros fatores, da escolha do tipo de marca-passo mais adequado a um paciente em particular. A escolha do tipo de

marca-passo, por sua vez, está diretamente relacionada ao diagnóstico preciso da patologia apresentada (Krishnaswami & Geraci, 1975).

A seguir será apresentada uma descrição resumida das características anatômicas, histológicas e fisiológicas do marca-passo natural do coração (o nódulo sinusal), bem como das patologias que comumente afetam esta estrutura e dos métodos utilizados para avaliar sua função.

1.1 O marca-passo cardíaco (nódulo sinusal)

Todas as células miocárdicas são potencialmente capazes de assumir atividade espontânea, mas aquelas que apresentam o maior grau de ritmicidade, as células do nódulo sinusal (NS), normalmente determinam a frequência de batimentos do órgão como um todo. Por esta razão, o NS é denominado marca-passo natural do coração e os ritmos que dele se originam são designados ritmos sinusais (Milnor, 1980).

Existe considerável variabilidade de tamanho e localização do NS mesmo em corações de animais da mesma espécie. No coração humano o NS possui aproximadamente dois centímetros de comprimento, dois milímetros de espessura e se estende a um milímetro sob o epicárdio próximo à junção entre a veia cava superior e o átrio direito (James et al., 1966) (Figuras 1.1 e 1.3).

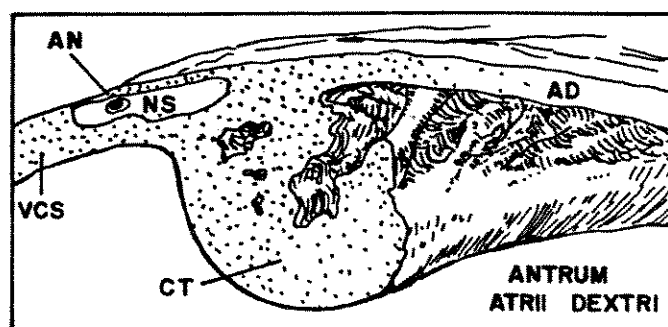


Figura 1.3 - Desenho esquemático ilustrando a localização do NS na junção da veia cava superior (VCS) com o átrio direito (AD). NS, nódulo sinusal; CT, crista terminalis; AN, artéria nodal. (modificado de James, 1977).

O suprimento sanguíneo do NS é feito por uma artéria (artéria nodal) relativamente grande (≈ 1 mm de diâmetro) orientada longitudinalmente à sua estrutura (Figura 1.3). Há evidência de que existem outras vias de irrigação do NS, possivelmente os pequenos ramos de ambas as artérias coronárias direita e esquerda (James & Nadeau, 1963). A drenagem venosa do NS é feita por pequenos canais diretamente para dentro do átrio direito (James et al., 1966).

O NS é formado por células individuais (células nodais) distribuídas em uma densa rede de colágeno ao redor da artéria nodal. A membrana externa das células nodais está ligada à rede de colágeno. Além das fibras de colágeno, o espaço intercelular contém capilares, pequenos ramos arteriais ou venosos e terminações nervosas. Dois tipos diferentes de células nodais são encontrados dentro da rede de colágeno: células P e células de transição. As células P são pequenas, esféricas ou ovóides, possuem um citoplasma límpido com um núcleo central desproporcionalmente grande, contêm poucas miofibrilas, pequenas mitocôndrias distribuídas aleatoriamente e apresentam junções intercelulares relativamente simples. Estas células, localizadas principalmente na região central do NS são, provavelmente, o local de origem do impulso sinusal. Estas células organizam-se em grupos semelhantes a um cacho de uva, o qual é revestido por uma única membrana basal. Na junção de uma célula P com outra, existem poucas especializações da membrana, tais como desmossomos, e quase nenhuma "gap junction". As células P também

formam junções com as células de transição, apresentando neste caso um maior número de especializações da membrana; não existe conexão entre as células P e as células atriais (James et al., 1966; James, 1977; James & Sherf, 1981).

As células nodais de transição são finas e alongadas, mas muito menores do que as células miocárdicas comuns. Comparadas às células P, estas células contêm mais mitocôndrias e miofibrilas organizadas longitudinalmente. As células de transição apresentam características intermediárias entre as células P e as células miocárdicas atriais e sua principal função é, provavelmente, a distribuição da atividade elétrica sinusal para fora do nódulo. As células de transição adjacentes às células P fazem contato com elas através de poucos desmossomos, enquanto que nos sítios de junção com as células atriais, observam-se numerosos desmossomos ou mesmo discos intercalares completamente desenvolvidos (James, 1977; Irisawa, 1978; James & Sherf, 1981; Brown, 1982).

Do ponto de vista eletrofisiológico, o potencial de ação (PA) das células nodais difere do PA das outras células miocárdicas em vários aspectos (Figura 1.4): (a) a velocidade de despolarização vista na fase 0 é mais lenta; (b) o potencial reverso é pequeno ou ausente; (c) o pico é arredondado; (d) a fase 2 apresenta um abrupto declínio sem ocorrência de platô; (e) o potencial de repouso é menor do que o encontrado para as células miocárdicas comuns (Milnor, 1980). Entretanto, a

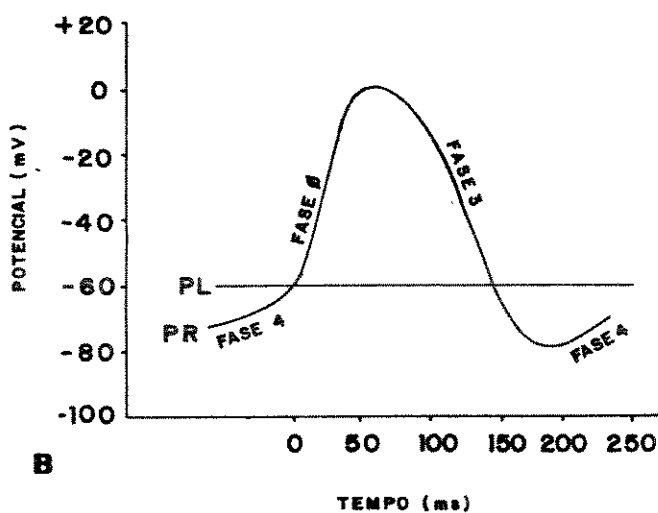
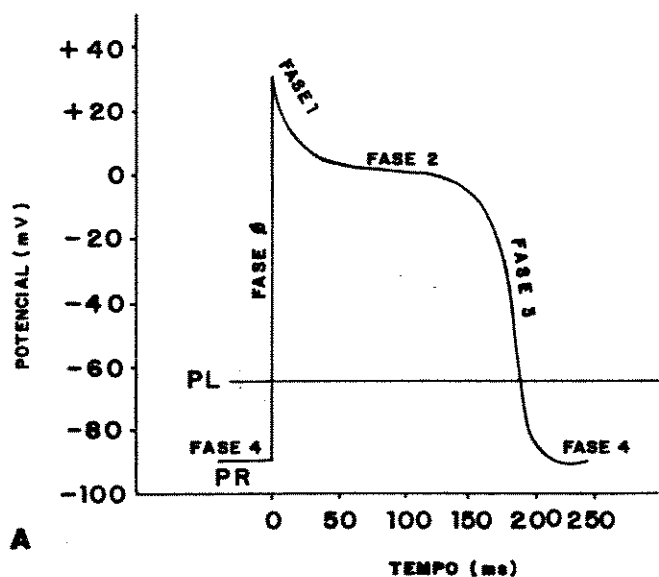


Figura 1.4 - Potencial de ação (PA) de dois tipos de células cardíacas. (A) PA de uma célula miocárdica comum (não automática), caracterizado por um potencial de repouso (PR) estável (fase 4). (B) PA de uma célula marca-passo do nódulo sinusal, caracterizado por uma despolarização espontânea durante a fase 4 e por uma despolarização de fase 0 bem mais lenta. PL, potencial limiar (de Marriott & Myerburg, 1981).

diferença fundamental entre o PA das células nodais e o PA das outras células miocárdicas é a despolarização espontânea (potencial marca-passo) que as células nodais apresentam durante a fase 4 (Irisawa, 1978; Milnor, 1980; Brown, 1982).

A despolarização espontânea, característica da atividade marca-passo, resulta de alterações dependentes de tempo e potencial, principalmente, nas condutâncias dos íons sódio e potássio através da membrana celular, embora outros íons (e.g. cálcio) também possam estar envolvidos (Mandel et al., 1975; Irisawa, 1978; Brown, 1982; Rosen, 1986).

Embora a ritmicidade seja uma propriedade inerente ao NS, sua atividade sofre modulação do sistema nervoso autonômico (Mandel et al., 1972). Próximo à região central do NS existem numerosas terminações nervosas das eferências simpática e parassimpática, assim como gânglios (presumivelmente colinérgicos) próximos à sua margem. A inervação parassimpática é feita por fibras colinérgicas, cujo neurotransmissor, a acetilcolina, tem efeito inibitório sobre o NS. Por outro lado, a noradrenalina, mediador químico das fibras adrenérgicas simpáticas, tem efeito excitatório. Desta forma, a interação do tônus simpático com o parassimpático exerce uma modulação da atividade marca-passo definindo a frequência cardíaca adequada às exigências fisiológicas (Mandel et al., 1975; Detweiler, 1976).

1.2 Patologias do nódulo sinusal

Dois mecanismos fisiopatológicos são os principais responsáveis pela disfunção do NS: distúrbios na automaticidade das células nodais e distúrbios na condução sino-atrial. Não é incomum ambas anormalidades existirem simultaneamente (Kaplan et al., 1973; Gizzi et al., 1981; Karagueuzian et al., 1985).

O quadro indicativo de falhas na função do NS é denominado de síndrome da doença do nódulo sinusal (SDN). A SDN é um conjunto de condições caracterizado por um ritmo cardíaco que é inadequado para as exigências fisiológicas (Fisher, 1981). Clinicamente, a SDN envolve não apenas distúrbios na formação do impulso sinusal e sua condução para o átrio, mas também distúrbios na condução da onda de ativação elétrica nos átrios e no sistema especializado de condução dos ventrículos (Bashour, 1985; Benditt et al., 1987). Frequentemente, a presença simultânea destas afecções leva ao aparecimento dos sintomas típicos da disfunção sinusal, as tonturas, desmaios, perda de consciência, palpitações geradas pela presença de bradi-taquiarritmias entre outras (Chung, 1978; Mond, 1981).

Os principais agentes etiológicos da SDN incluem a intoxicação digitálica ou quinidínica, o infarto do miocárdio atrial, cirurgia cardíaca para correção de comunicação interatrial, lesão torácica, obstruções arteriais, endocardite, pericardite, alterações esclerótico-degenerativas do NS e da junção sino-atrial e as cardiomiopatias (e.g. doença de Chagas)

(Scarpa, 1976; Chung, 1978; James, 1977; Thery et al., 1977; Jordan et al., 1978; Ferrer, 1982; Bashour, 1985).

De modo geral, a coexistência de vários agentes etiológicos na SDN pode levar a degeneração direta das células nodais (células P ou de transição), excessiva proliferação de fibras de colágeno e obstruções do fluxo sanguíneo para o NS, afetando diretamente o seu funcionamento, ou por outro lado de modo indireto, afetando a função básica do marca-passo natural cardíaco por alterações na condução sino-atrial, atrial e átrio-ventricular.

1.3 Testes para avaliação da função do nódulo sinusal

A avaliação das disfunções do NS é frequentemente difícil e representa um dilema para o médico no estabelecimento não só de um diagnóstico, como também de um procedimento terapêutico (e.g. implante de marca-passo artificial), pois a disfunção do NS, está usualmente associada a uma variedade de sinais e sintomas não específicos. Na SDN, os sintomas são frequentemente intermitentes, e a função sinusal apresenta-se aparentemente normal nos períodos assintomáticos. A natureza intermitente da doença leva à necessidade de múltiplos testes, nenhum dos quais sozinho, é suficientemente específico, para que o diagnóstico e a seleção do procedimento terapêutico possam ser objetivamente estabelecidos (Karagueuzian et al., 1985; Benditt et al., 1987).

Na tentativa de se estabelecer o maior rigor diagnóstico possível, a avaliação clínica para caracterização da SDN tem sido apoiada por vários exames complementares, alguns dos quais (os mais utilizados) serão discutidos a seguir.

1.3.1 Monitoração contínua do Eletrocardiograma por períodos prolongados ("Holter")

É um dos métodos de maior poder diagnóstico na SDN. Consiste do registro de anormalidades eletrocardiográficas associadas a sintomas, tais como bradicardia sinusal acentuada ou parada sinusal, coincidente com tontura ou perda de consciência. Entretanto, devido à natureza intermitente da doença, isto nem sempre é possível, mesmo quando a monitoração contínua por longos períodos é efetuada. Além disso, deve-se lembrar que sintomas podem não estar associados a anormalidades eletrocardiográficas, ou, ao contrário, existir evidência de alteração no eletrocardiograma sem o correspondente sintoma (Mandel et al., 1975; Fisher, 1981; Karagueuzian et al., 1985).

1.3.2 Resposta ao esforço físico

O propósito deste método é avaliar a capacidade do NS de aumentar sua frequência de forma adequada em resposta ao esforço físico (Goldberg et al., 1970; Mandel et al., 1975). Esta resposta cronotrópica positiva é provavelmente o reflexo de uma atividade simpática aumentada, de uma diminuição da atividade

parassimpática ou ambos (Maciel et al., 1986). Exercícios simples (e.g. rápida flexão do braço ou perna por um curto período) podem produzir resultados informativos. Uma atenuação do aumento de frequência cardíaca em resposta a um esforço físico em pacientes com SDN foi descrito por Mandel et al. (1972). Holden et al. (1978) sugeriram que uma resposta anormal da frequência cardíaca ao exercício pode ser útil na identificação de pacientes com SDN. Entretanto, visto que alguns pacientes com SDN podem responder quase normalmente ao exercício, são comuns os casos de falso-negativo neste tipo de teste (Abbott et al., 1977).

1.3.3 Estimulação do seio carotídeo

Esta manobra é realizada pela massagem do seio carotídeo direito por um período acima de 10 segundos, enquanto que o eletrocardiograma é monitorado continuamente (Mandel et al., 1972; Scarpa, 1976; Karagueuzian et al., 1985). Uma pausa entre batimentos maior do que 3 segundos após a estimulação do seio carotídeo tem sido observada em pacientes com suspeita de disfunção do NS (Agrus et al., 1972; Scarpa, 1976; Thorman et al., 1978). No entanto, em pacientes com sensibilidade aumentada à estimulação do seio carotídeo, o uso desta manobra pode conduzir a graves problemas hemodinâmicos (Mandel et al., 1975).

1.3.4 Manobra de Valsalva

A manobra de Valsalva é realizada utilizando-se um "clip" oclusivo no nariz e um bocal conectado a um transdutor de pressão (Gorlin et al., 1957; Mandel et al., 1972). As manobras são realizadas por 10 segundos nas pressões de 10, 20, 30 e 40 mmHg. Este procedimento, induz variações na pressão arterial sistêmica, que em fases específicas devem ser acompanhadas de variações características de frequência cardíaca. Em pacientes com SDN, pode ocorrer uma resposta pressórica normal, sem as correspondentes mudanças na frequência cardíaca. Infelizmente, anormalidades na resposta da frequência cardíaca à manobra de Valsalva são por muitas vezes inespecíficas para SDN (Mandel et al., 1972; Mandel et al., 1975).

1.3.5 Testes farmacológicos

A ritmicidade do NS sofre grande influência do sistema nervoso autônomo (Mandel et al., 1975). Os sinais, sintomas e anormalidades registradas no eletrocardiograma, característicos da SDN, podem ocorrer devido a atividade autonômica alterada. Para testar esta possibilidade, bloqueadores autonômicos são administrados a pacientes com suspeita de SDN. Este teste é realizado analisando-se a frequência cardíaca antes e após o uso de atropina ou propranolol. Atropina ou propranolol são administrados ao paciente por via endovenosa para obter-se um bloqueio da influência parassimpática ou simpática, respectivamente, sobre o NS. Após administração de atropina, o

ritmo e a frequência são monitorados durante 30 minutos (teste da atropina). Os indivíduos normais apresentam um aumento da frequência cardíaca acima de 90 bpm nos primeiros 30 segundos. Os resultados indicativos de SDN incluem a presença de pausas secundárias e falha do NS em aumentar sua frequência acima de 90 bpm. Em indivíduos normais a administração de propranolol resulta em uma diminuição da frequência cardíaca de 12% a 22%. Entretanto, em pacientes com SDN, existe uma redução mais acentuada podendo ocorrer bloqueio ou assistolia. Por outro lado, a inexistência de quantificação dos efeitos destes bloqueadores autonômicos em pacientes normais dificulta a interpretação dos resultados obtidos em pacientes com SDN (Mandel et al., 1972; Rosen et al., 1975; Lucchesi, 1979; Singh et al., 1980; Gizzi et al., 1981; Karagueuzian et al., 1985).

A "desnervação" farmacológica do NS pode ser conseguida pela administração de 0,2 mg/kg de propranolol seguida por 0,04 mg/kg de atropina, obtendo-se em resposta a frequência cardíaca intrínseca, que é definida como a frequência de despolarizações espontâneas do NS "independente" da ação do sistema nervoso autonômico (Fisher, 1981). Utilizando-se este método, pacientes com disfunções intrínsecas do NS podem ser distinguidos daqueles pacientes com alterações da modulação autonômica da função sinusal (José, 1966; Jordan et al., 1978; Fisher, 1981; Karagueuzian et al., 1985).

1.3.6 Exame eletrofisiológico

Neste caso cateteres-eletrodos são introduzidos nas cavidades cardíacas e posicionados próximo à junção da veia cava superior com o átrio direito ou dentro do seio coronário (Scarpa, 1976), visando registrar a atividade elétrica espontânea do tecido cardíaco ou sua resposta à perturbações produzidas por estimulação elétrica. A resposta a estas perturbações tem sido utilizadas na avaliação da função do nódulo sinusal (Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972; Strauss et al., 1973; Fisher, 1981; Gizzi et al., 1981; Tonkin & Heddle, 1984; Schweitzer & Mark, 1984; Karagueuzian et al., 1985; Cain, 1987; Yee & Strauss, 1987), e consideradas importantes na escolha do tipo de marca-passo mais adequado no caso de implante (Mond, 1981; Michelson & Dreifus, 1984; Benditt et al., 1987).

No exame eletrofisiológico, um dos parâmetros avaliados para caracterização da SDN é o tempo de condução sino-atrial (TCSA), medido diretamente a partir do registro extracelular do eletrograma do NS (Klein et al., 1973; Reiffel et al., 1974; Breithardt et al., 1977; Hariman et al., 1980; Reiffel et al., 1980; Gomes et al., 1982; Tonkin & Heddle, 1984). O eletrograma do NS é caracterizado por uma inclinação diastólica que precede a onda P do eletrocardiograma e o eletrograma intra-atrial, e aparece imediatamente após o intervalo T-U (Karagueuzian et al., 1985). O TCSA pode ser estimado diretamente pela medição do tempo decorrido entre o início da deflexão do

eletrograma sinusal e o início da ativação atrial (onda P do eletrocardiograma) (Gomes et al., 1982). Este método apresenta várias dificuldades técnicas no registro do eletrograma do NS, devido a alta amplificação necessária, a dificuldade no controle de oscilações de linha de base e de estabelecimento de critérios para filtragem adequada do sinal (Yee & Strauss, 1987).

A partir da estimulação elétrica atrial, o TCSA tem sido determinado por dois métodos, diferindo basicamente no regime de estimulação aplicada ao tecido cardíaco: o método da estimulação atrial prematura (EAP) (Strauss et al., 1973) e o método da estimulação com trem de pulsos (EATp) (Narula et al., 1978). No primeiro, estímulos elétricos aplicados ao tecido atrial são conduzidos em sentido retrógrado para o NS, produzindo sua despolarização. A partir disto e do tempo para nova despolarização atrial espontânea, vinda do NS, mede-se os tempos de condução átrio-nódulo e nódulo-átrio de modo rápido e simplificado (Strauss et al., 1973; Miller & Strauss, 1974; Gizzi et al., 1981; Tonkin & Heddle, 1984). Entretanto, a aplicação prática dos valores de TCSA determinados pelo método da EAP é limitada (Tonkin & Heddle, 1984), pois este método requer suposições (e.g. que o estímulo extra não deva suprimir a automaticidade do NS, que os tempos de condução retrógrado e anterógrado devam ser iguais, que a velocidade de condução átrio-NS deva ser independente do local de estimulação (Strauss et al., 1973; Karagueuzian et al., 1985)), que nem sempre são verdadeiras, principalmente em pacientes com BDN (Tonkin &

Heddle, 1984; Karagueuzian et al., 1985; Yee & Strauss, 1987).

Para determinação do TCSA pelo método da EATp, o átrio direito é estimulado com um trem de oito pulsos em uma frequência 5 a 10 bpm acima da frequência espontânea (Narula et al., 1978). Em ambos os métodos (EAP e EATp), na estimação indireta do TCSA assume-se que a diferença entre a pausa após estimulação e o intervalo espontâneo médio seja igual ao tempo de condução sino-atrial total (retrógrado + anterógrado) (Strauss et al., 1973; Narula et al., 1978).

Independentemente do método utilizado para a estimação indireta do TCSA, o número de pacientes com SDN apresentando um valor de TCSA fora da faixa de normalidade é baixo (< 50%), sugerindo que estes métodos apresentam baixa especificidade (Strauss et al., 1976; Kang et al., 1982; Karagueuzian et al., 1985).

Outro parâmetro de grande importância diagnóstica, avaliado durante o exame eletrofisiológico do coração é o chamado tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS). Com este parâmetro procura-se avaliar a automaticidade do NS.

Mandel et al. (1971), mostraram que após o término de estimulação elétrica contínua (EAC) do átrio direito em frequências superiores a frequência natural (método da EAC), segue-se uma supressão temporária da atividade espontânea. O intervalo entre o último estímulo elétrico aplicado e a primeira

despolarização atrial de origem sinusal é tomado como um indicador do grau de supressão da automaticidade do NS e é denominado TRNS. As observações iniciais mostraram que o TRNS é anormalmente prolongado em pacientes com SDN (Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972; Scarpa, 1976; Gizzi et al., 1981; Tonkin & Heddle, 1984; Pachón et al., 1986; Benditt et al., 1987). Para uma análise mais adequada, corrigi-se o TRNS em relação a frequência cardíaca subtraindo-se do valor de TRNS obtido o intervalo espontâneo médio apresentado pelo paciente antes do início da estimulação externa. Este valor é denominado TRNS corrigido (TRNSc). Esta forma de expressão elimina o efeito das variações da frequência cardíaca sobre o TRNS (Narula et al., 1972).

Embora não muito difundido, o método da EAP também já foi utilizado para obtenção do TRNS (Narula et al., 1972). Apesar da estimulação neste caso, ser bem menos agressiva, uma comparação detalhada das vantagens clínicas de um ou outro método não parece disponível na literatura.

A definição exata dos limites de normalidade para o TRNS é ainda um pouco controversa, contudo valores de TRNS acima de 1600 ms e de TRNSc acima de 525 ms são fortemente correlacionados com disfunções do NS (Benditt et al., 1987).

Deve-se salientar que embora o TRNS seja importante indicador de disfunções do NS, sua especificidade é ainda considerada baixa (Cain, 1987; Yee & Strauss, 1987) e certamente

o conhecimento e aprimoramento dos métodos de medição e das particularidades eletrofisiológicas das diversas patologias poderão melhorar no futuro o valor diagnóstico do parâmetro na SDN.

Atualmente, com o advento da estimulação cardíaca transesofágica, a medição do TRNS e do TRNSc tem sido efetuada de modo não-invasivo (estimulação atrial por meio de um cateter localizado no esôfago) (Pachón et al., 1986) e constitui exame complementar praticamente obrigatório na caracterização da SDN e no auxílio a decisão quanto ao implante de marca-passo artificial (Pachón, J.C., II Simpósio sobre Arritmias Cardíacas da Unicamp, 1989).

Embora todos os métodos apresentados possuam limitações se usados isoladamente para caracterização da SDN, parece consenso na literatura médica, que a associação criteriosa dos exames clínicos gerais aos exames complementares, em especial aos testes eletrofisiológicos, tem possibilitado um índice crescente de acerto diagnóstico facilitando e melhorando a conduta terapêutica tanto por meio de medicamentos quanto cirúrgica ou de implante de marca-passo artificial (Benditt et al., 1987; Cain, 1987; Yee & Strauss, 1987).

No presente trabalho os métodos para avaliação da função do NS por meio da estimulação elétrica constituem o alvo de estudo. Apresenta-se uma nova metodologia e instrumentação, que possibilitam medir o TRNS em preparações com tecido cardíaco

isolado de pequenos animais. Foram implementados e comparados os métodos da EAC e da EAP para obtenção do TRNS. Além disso, perturbações controladas (e.g. desequilíbrio iônico e presença de neurotransmissores) foram impostas ao tecido cardíaco e, nestas condições, analisados os valores obtidos para o TRNS.

1.4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram o desenvolvimento de metodologia e instrumentação para estudo in vitro do tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS) utilizando tecido cardíaco isolado de rato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* var. albina) Wistar machos, pesando de 200 a 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas, no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) - Unicamp, recebendo água e ração *ad libitum* e não sofreram qualquer manipulação experimental até o dia de serem utilizados.

2.2 Produtos Químicos

Foram utilizados os seguintes sais, todos de padrão analítico (Merck A.G.): cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio bihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato ácido de potássio (KH_2PO_4), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3), além de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Os seguintes fármacos foram usados: cloridrato de propranolol, sulfato de atropina, (-) arterenol base livre (noradrenalina) e acetilcolina (fabricação Sigma co., USA).

2.3 Soluções Fisiológicas

a) solução nutriente controle: como solução controle foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição química: NaCl - 115,0 mM, KCl - 4,6 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,5 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,2 mM, NaHCO_3 - 25,0 mM, KH_2PO_4 - 1,2 mM e glicose - 11,1 mM. Esta solução apresentou pH de $7,4 \pm 0,2$, e osmolalidade (atividade osmolar medida) de 298 ± 3 mOsm/l.

b) solução nutriente com atropina e propranolol: esta solução foi obtida adicionando-se à solução controle sulfato de atropina (concentração final 100 nM) e cloridrato de propranolol (concentração final 30 nM), para bloqueio de receptores colinérgicos muscarínicos e beta adrenérgicos, respectivamente.

c) solução nutriente com concentração de KCl ([KCl]) aumentada: esta solução foi obtida pela adição de KCl à solução nutriente descrita no item (b). Obtendo-se uma concentração final de KCl de 6,1 mM ($\Delta[\text{KCl}] = + 1,5$ mM).

d) solução nutriente com [KCl] reduzida: para obtenção desta solução, reduziu-se a concentração de KCl da solução nutriente descrita no item (b). Obtendo-se uma concentração final de KCl de 3,1 mM ($\Delta[\text{KCl}] = - 1,5$ mM).

e) solução nutriente com aumento progressivo da [KCl]: esta solução nutriente foi obtida a partir de uma solução de Krebs-Henseleit com atropina e propranolol, cuja concentração inicial de KCl foi de 1,6 mM. A partir de uma solução estoque de cloreto de potássio (0,7456 g de KCl em 10 ml de água) a [KCl] foi progressivamente aumentada por adição de 0,01 ml da solução estoque de KCl em 20 ml de solução de Krebs-Henseleit, produzindo incrementos de 0,5 mM na [KCl].

f) solução estoque de noradrenalina: consistia de uma solução de noradrenalina na concentração de 20 mM. As diluições foram realizadas imediatamente antes do início dos experimentos em solução de Krebs-Henseleit, e conservadas em banho de gelo. As concentrações utilizadas foram: 10, 30 e 100 nM.

g) solução estoque de acetilcolina: consistia de uma solução de acetilcolina na concentração de 20 mM. As diluições foram realizadas imediatamente antes do início dos experimentos em solução de Krebs-Henseleit, e conservadas em banho de gelo. As concentrações utilizadas foram: 1, 3 e 10 μ M.

2.4 Metodologia e Instrumentação desenvolvidas

2.4.1 Preparação biológica e registros típicos

Foram utilizadas preparações com aurículas direitas isoladas de ratos, com base na proposta de Hawkins (1962) para

estudos farmacológicos em aurículas direitas isoladas de cobaia. A Figura 2.1 ilustra a montagem experimental usada neste trabalho.

Os animais foram sacrificados com um forte golpe na cabeça e imediata secção dos vasos sanguíneos cervicais para rápido escoamento do sangue do interior das cavidades do coração, minimizando a presença de coágulos que pudessem dificultar a nutrição do tecido. A aurícula direita foi dissecada e montada para registro isométrico de força (transdutor de força modelo F60, Narco Bio-systems) sob tensão inicial de 0.5 gf, em banho para órgão isolado (20 ml), contendo solução de Krebs-Henseleit (36.5°C , 95% O_2 ; 5% CO_2). Em uma das extremidades da aurícula direita foi fixado um eletrodo constituído de quatro fios de platina (diâmetro aproximado 0.25 mm, separação 1 mm), montados em um suporte de acrílico. Este eletrodo tetrapolar foi usado tanto para detecção da atividade elétrica atrial (eletrograma atrial) quanto para estimulação elétrica do tecido cardíaco.

Os eletrogramas e as contrações atriais foram monitorados por meio de um osciloscópio de quatro canais, com memória de fósforo (Tektronix, mod. 5111A, 5A14N, "Four channel amplifier") durante todo experimento. A observação simultânea da ocorrência de contrações correspondentes às despolarizações, possibilitou descartar experimentos com preparações nas quais a atividade elétrica não era acompanhada da correspondente atividade contrátil, sugerindo falha no processo de excitação-

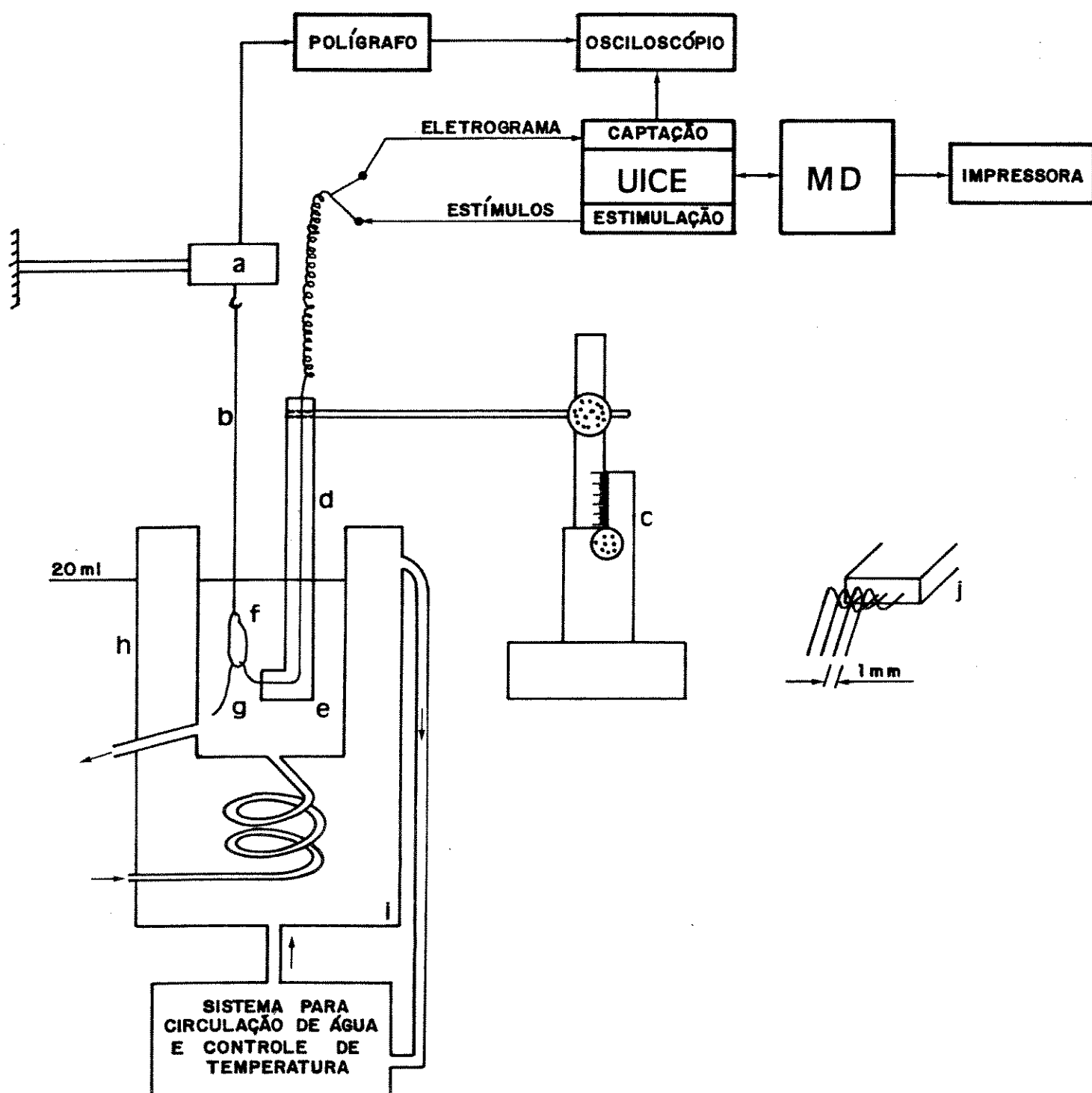


Figura 2.1 - Montagem experimental e instrumentação utilizada para determinação do tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS) em átrio direito isolado de rato. (a) transdutor de força; (b) fio de algodão; (c) micromanipulador; (d) haste acrílica dos eletrodos; (e) solução fisiológica; (f) aurícula direita; (g) eletrodos de platina; (h) câmara de vidro; (i) água à temperatura de 36,5 C; e (j) vista frontal dos eletrodos utilizados para estimulação elétrica e captação da atividade elétrica atrial. MD - microcomputador dedicado; UICE - unidade isolada de captação e estimulação.

contração cardíaca.

A Figura 2.2 ilustra os registros típicos obtidos em tecido auricular direito isolado de rato. São apresentados o eletrograma atrial, a tensão desenvolvida pelo tecido e os sinais de sincronismo fornecidos pelo sistema de detecção da atividade elétrica atrial (vide item 2.4.3, descrição da UICE - unidade isolada de captação e estimulação), o qual faz parte do "hardware" do sistema desenvolvido neste trabalho.

2.4.2 Modelo teórico para determinação do tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS)

Anatomicamente a preparação biológica descrita no item 2.4.1, deste trabalho, pode ser dividida em três regiões ou faixas, de acordo com o tipo de tecido cardíaco: a região nodal ou do nódulo sinusal (NS), na qual estão localizadas as células do marca-passo primário do coração, a região atrial (A) onde se localizam células musculares ordinárias do tecido auricular de contração e uma região intermediária ou juncional (JSA - junção sinoatrial), na qual as células se apresentam diferenciadas, caracterizando uma transição anatômica do tecido nodal para o tecido auricular.

Do ponto de vista funcional a atividade elétrica se inicia na região nodal, atinge a região juncional, onde sofre um atraso devido a sua lenta condução na JSA (Strauss & Bigger, 1971 e 1972), até atingir a região atrial que será rapidamente

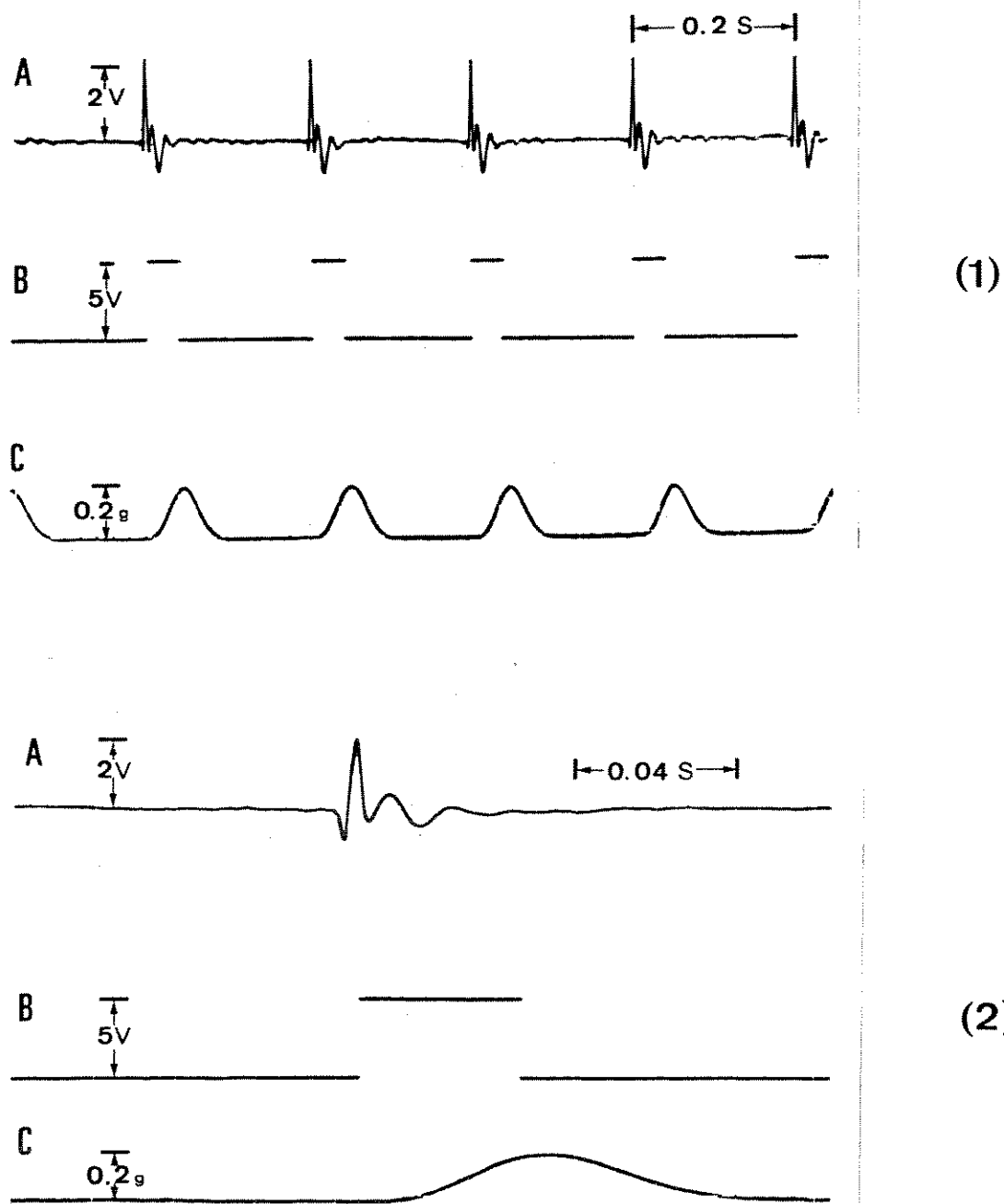
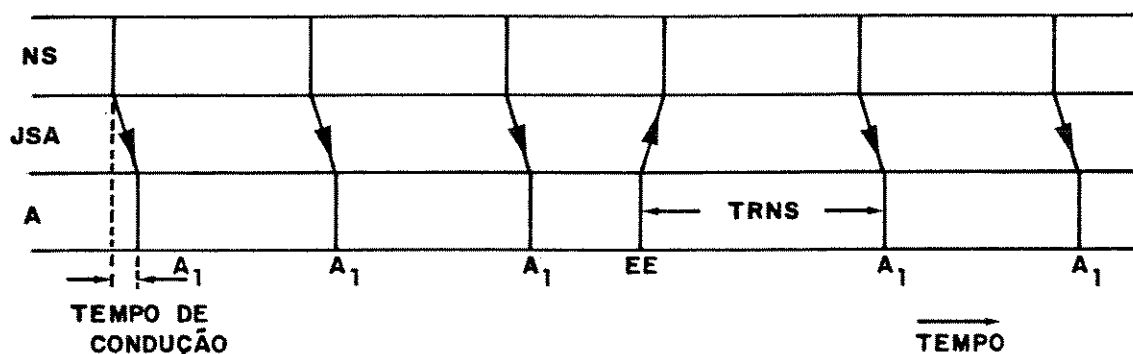


Figura 2.2 - Registros típicos obtidos em átrio direito isolado de rato. Em (1) são apresentados: (A) eletrograma atrial; (B) sinal de sincronismo fornecido pelo sistema de detecção da atividade elétrica atrial; e (C) tensão desenvolvida pelo tecido. Em (2) os mesmos traçados são apresentados em escala horizontal expandida. Amplificação em (A) 8000 x.

despolarizada. Este comportamento funcional pode ser representado no diagrama em escada ("ladder diagram") da Figura 2.3. Este diagrama ilustra um modelo teórico (Strauss et al., 1973), no qual considera-se desprezível o atraso de condução da onda de excitação nas regiões nodal e atrial. As barras verticais indicam a despolarização de cada região. O tempo de condução entre as regiões NS e A é representado pelas barras inclinadas. Assume-se como premissa, que apenas na JSA ocorra um atraso significativo no trajeto da onda de excitação entre o NS e o átrio.

A partir deste modelo, estímulos elétricos aplicados à região atrial provocam uma onda de excitação que pode invadir a região nodal e inibir temporariamente a atividade marca-passo (provocar um "reset", condição na qual duas vezes o intervalo espontâneo ($A_T A_T$) é maior do que a soma dos intervalos correspondentes a prematuridade do estímulo extra ($A_T EE$) e a pausa após estimulação ($EE - A_T$), Figura 2.3). A ocorrência de "reset" depende da fase do intervalo diastólico atrial espontâneo na qual o estímulo é aplicado. O tempo necessário para recuperação da atividade elétrica espontânea após estimulação é denominado tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS).

No presente trabalho o modelo para determinação do TRNS foi testado a partir de dois métodos: (a) estimulação atrial prematura (EAP) (estímulos extras aplicados dentro do ciclo de despolarizações espontâneas). A condição de "reset" foi observada para estímulos extras aplicados na faixa de 25% a 80% do



$$\text{RESET: } (A_1 - EE) + (EE - A_1) \times 2 \times (A_1 - A_1)$$

Figura 2.3 - Diagrama representando o modelo teórico da condução da onda de ativação na região nodal (NS), na junção sinoatrial (JSA), e no átrio (A). O intervalo ($A_1 - EE$) corresponde à 55% do intervalo diastólico atrial espontâneo ($A_1 - A_1$). Um estímulo extra (EE) aplicado com esta prematuridade, provoca uma onda de excitação que se propaga em sentido retrógrado, invadindo e produzindo "reset" do NS. O intervalo ($EE - A_1$) é o tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS).

intervalo diastólico espontâneo, após a detecção de uma despolarização atrial. O valor de TRNS, neste caso, foi aproximadamente constante (Figura 2.4); e (b) estimulação atrial contínua (EAC). As frequências estimulatórias usadas foram tais que os intervalos entre estímulos fossem compatíveis com os intervalos de estimulação do método descrito em (a). Em ambos os métodos foi calculado o tempo de recuperação corrigido ($TRNSc = TRNS$ menos o intervalo espontâneo médio), para eliminar o efeito da frequência espontânea, permitindo, assim, a avaliação dos valores de TRNS mesmo na presença de variações da frequência sinusal espontânea (Narula et al., 1972). A Figura 2.5 ilustra alguns testes do modelo para obtenção do TRNS. Estímulos extras (EE) são aplicados em 65% (Figura 2.5-1) e 35% (Figura 2.5-2) do intervalo diastólico atrial espontâneo. O diagrama em escada (Figura 2.5) ilustra, esquematicamente, a condução do impulso nas regiões do modelo teórico da preparação biológica estudada. A condição de "reset" foi observada nas duas situações, pois, $(2 \times 208) > (135 + 278)$ e $(2 \times 208) > (74 + 271)$, respectivamente. Na figura 2.6, estimulação atrial contínua durante 5 segundos, na frequência de 460 est./min. (53% acima da frequência espontânea), é aplicada ao tecido cardíaco isolado, para determinação do TRNS.

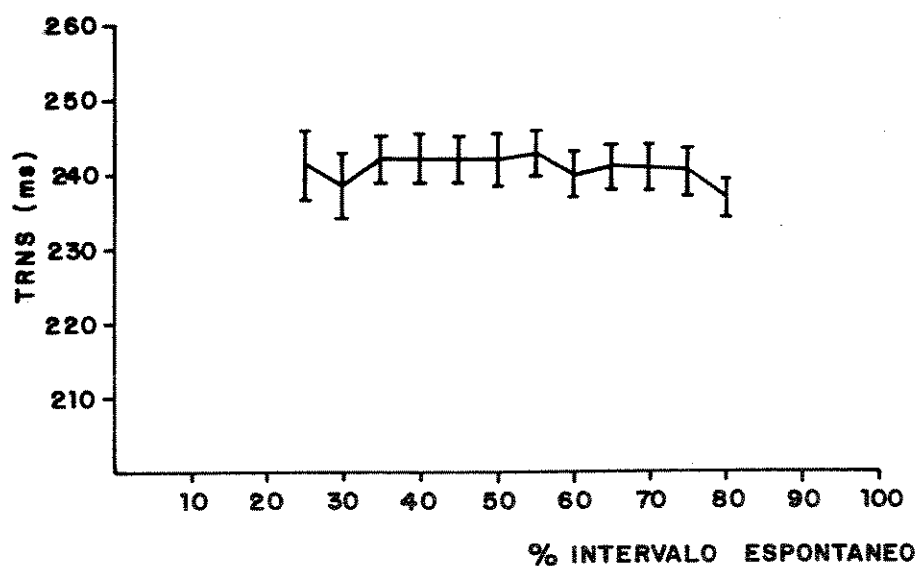


Figura 2.4 - Tempo de recuperação do nóculo sinusal, TRNS (MÉDIA $\pm$ EPM), determinado em átrio direito isolado de rato. Foi utilizado o método da estimulação atrial prematura, com estímulos extras aplicados na faixa de 25% a 80% do intervalo diastólico atrial espontâneo. $n=10$.

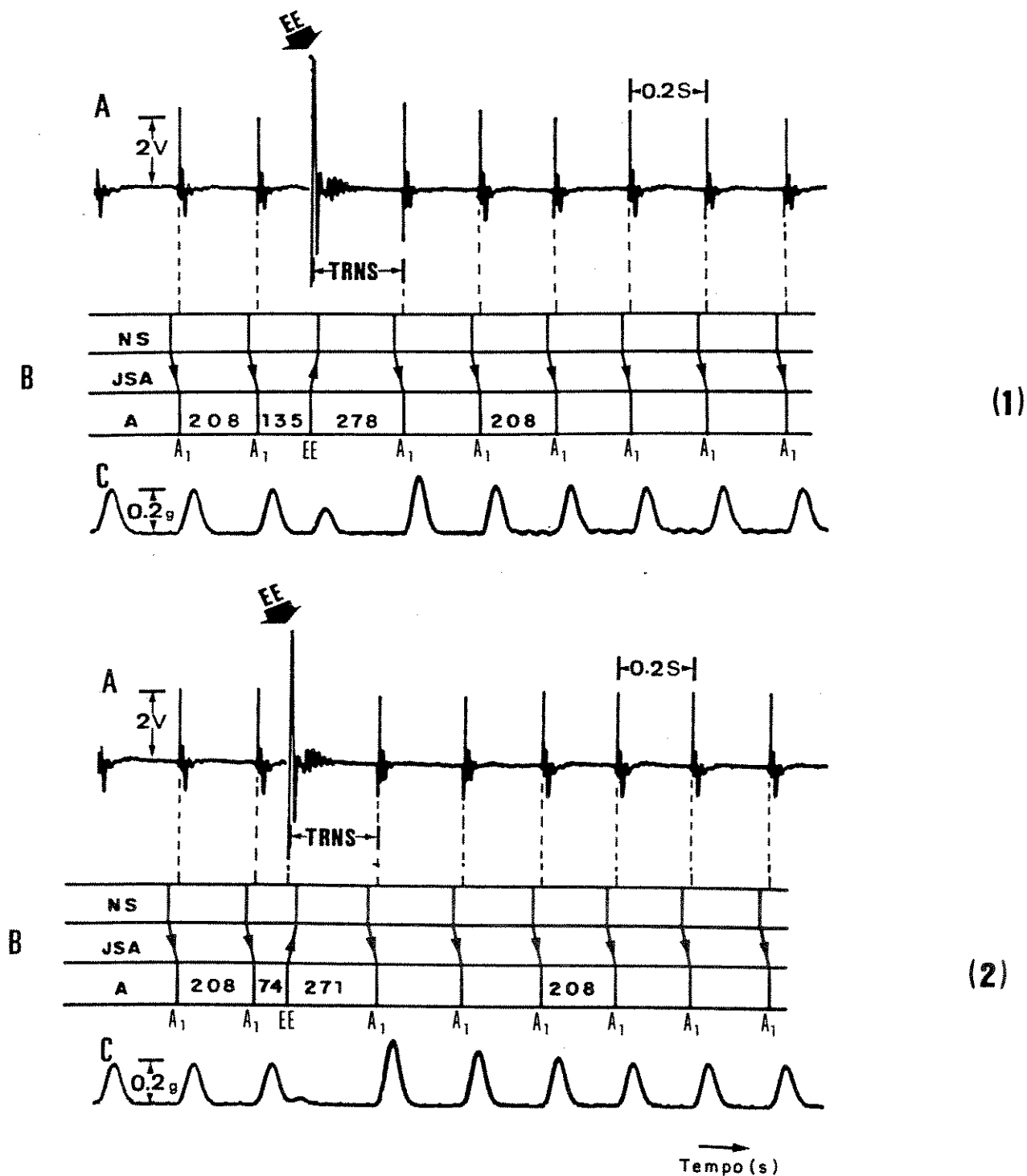
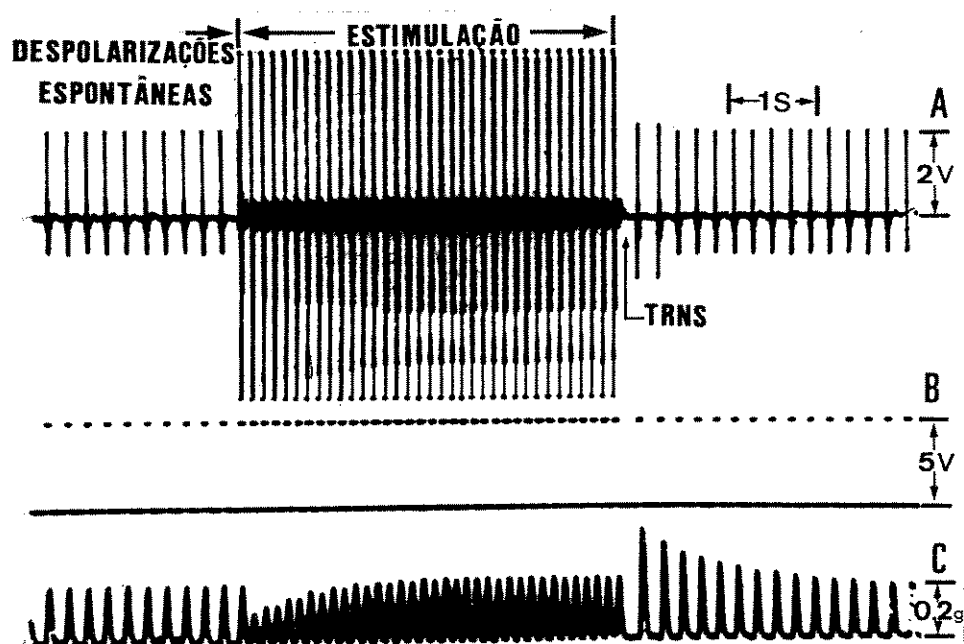
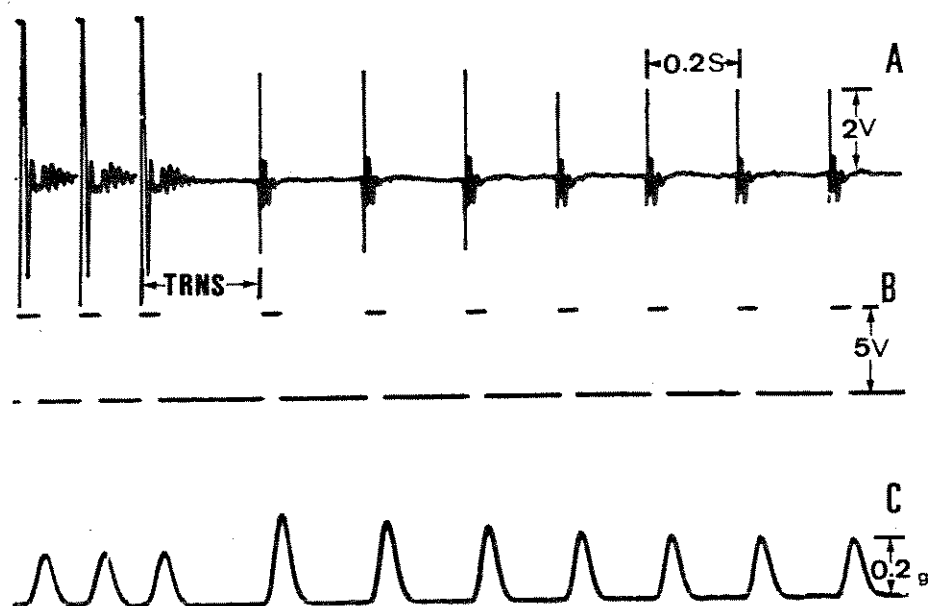


Figura 2.5 - TRNS determinado em átrio direito isolado de rato, utilizando-se o método da estimulação atrial prematura. Estímulos extras (EE), são aplicados em 65% (1) e 35% (2) do intervalo diastólico atrial espontâneo. Nestas prematuridades de estímulo, a onda de ativação ganha acesso e despolariza o NS, provocando "reset". Em (1) e (2) são apresentados: (A) eletrograma atrial e (C) força de contração. Os diagramas em escada (B) ilustram a condução da onda de ativação na região do nóculo sinusal (NS), na junção sinoatrial (JSA) e no átrio (A). (A_1-A_1) = intervalo diastólico atrial espontâneo; (A_1-EE) = intervalo de prematuridade; ($EE-A_1$) = TRNS. Todos os intervalos são dados em ms.



(1)



(2)

Figura 2.6 - TRNS determinado em átrio direito isolado de rato, utilizando-se o método da estimulação atrial contínua, durante 5 s, na frequência de 460 estímulos/min. Em (1) são apresentados: (A) despolarizações atriais espontâneas, período de estimulação e TRNS; (B) sinal de sincronismo; e (C) força de contração. Em (2) os traçados A, B e C, são apresentados em escala horizontal expandida. Em (A) a atividade elétrica atrial, durante estimulação, é contaminada pelo artefato de estímulo.

2.4.3 Instrumentação

Para atingir os objetivos do presente trabalho foi desenvolvida uma instrumentação (vide circuitos elétricos no apêndice) baseada em microprocessador ("hardware" e "software"), que possibilita o estudo in vitro de métodos para estimulação cardíaca sincronizada, em particular, dos métodos para avaliação da função automática do nódulo sinusal.

2.4.3.1 "Hardware"

O diagrama em blocos do sistema desenvolvido é apresentado na Figura 2.7. O sistema é composto por uma unidade isolada de captação de sinais e estimulação (UICE) conectada a um microcomputador dedicado (MD) desenvolvido com base no microprocessador INTEL 8085A.

Por meio do painel de controle do instrumento o sistema pode ser preparado para execução de uma determinada tarefa, previamente programada e armazenada na memória. Na presente configuração o sistema contém 2048 posições (2 kbyte) de memória fixa (EPROM, "Erasable Programmable Read Only Memory") para armazenamento do sistema operacional e programas aplicativos básicos, e 1024 posições (1 kbyte) de memória volátil (RAM, "Random Access Memory") para área de trabalho e armazenamento temporário de dados.

Entradas de dois tipos são reconhecidas pelo

sistema: dados numéricos (um código decimal para seleção de tarefas e dados tais como o tempo de estimulação) e um pulso de sincronismo fornecido pela UICE, correspondente à cada despolarização atrial. Duas chaves do tipo "pushbutton" do painel de controle, Ler (L) e Carregar/Início (C/I), conectadas respectivamente às interrupções de "hardware" 5.5 e 6.5 do microprocessador, são usadas para controlar a entrada e a saída de dados do sistema.

Os pulsos de sincronismo fornecidos pela UICE podem ser diretamente reconhecidos pelo MD, que testa, por "software", a "flag" (0 ou 1) da interrupção de "hardware" 7.5 do microprocessador. Os dados numéricos de entrada, e também os resultados são apresentados no "display" numérico do painel de controle, para visualização. Um relatório final com os resultados obtidos pode ser impresso para documentação dos experimentos. Indicadores luminosos ("leds") no painel de controle sinalizam qual a operação que está sendo executada no momento.

Uma interface paralela programável (INTEL 8255) foi usada para realizar toda comunicação entre o usuário e o sistema (controle da entrada de dados numéricos e de todas as saídas). As portas A e B da interface paralela foram utilizadas para transferência de dados do microcomputador para a impressora, e controle da entrada e apresentação de dados no "display" numérico do painel de controle. Os indicadores luminosos foram ligados aos bits de 0 a 4 da porta C, enquanto que os bits 6 e 7,

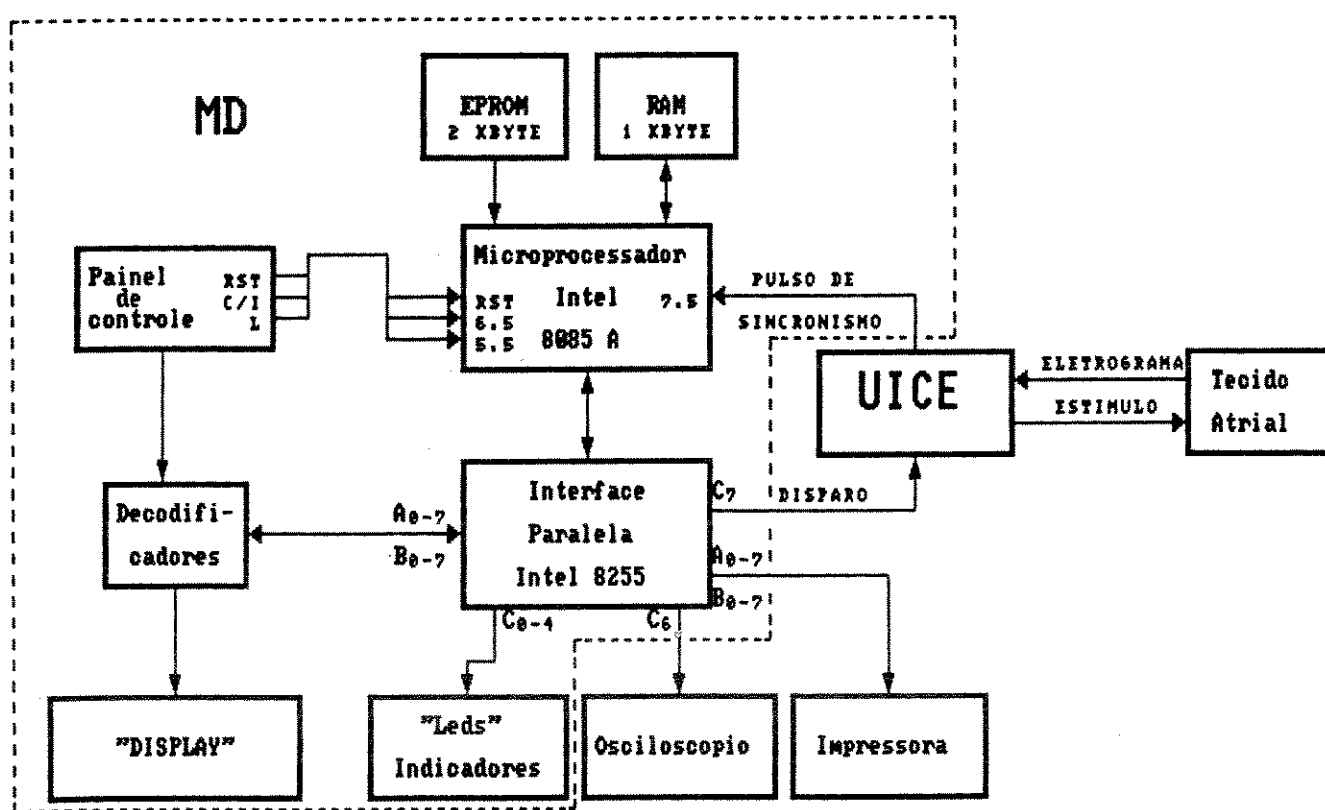


Figura 2.7 - Diagrama em blocos da instrumentação desenvolvida para determinação do TRNS in vitro. MD - microcomputador dedicado; UICE - unidade isolada de captação/estimulação.

foram usados, respectivamente, para disparo ("trigger") do osciloscópio e do circuito de estimulação (secção B, Figura 2.8 - UICE).

Na Figura 2.8 é apresentado um diagrama em blocos da unidade isolada de captação e estimulação (UICE). Na secção A é apresentado o diagrama em blocos do circuito de captação. Nesta secção, os eletrogramas atriais são amplificados (Amplificador de instrumentação baseado no LM 725 amp. op., CMRR 120 dB, ganho 20 x) e filtrados (Filtro passa-faixa, PA = 5 Hz e PB = 150 Hz) para eliminar ruídos de alta frequência e oscilações de linha de base. O sinal resultante é opticamente acoplado a um amplificador de ganho variável (1500, 3000, 8000 e 16000 x). Um filtro notch-60 Hz é utilizado após o amplificador para minimizar interferências da rede elétrica. Finalmente, o sinal é alimentado a um circuito detector de picos, o qual gera um pulso retangular (nível TTL, "Transistor Transistor Logic") a cada despolarização atrial detectada. Este sinal é utilizado como pulso de sincronismo, para informar ao microcomputador a ocorrência da atividade elétrica do tecido atrial (vide Figura 2.2, pág.30).

O diagrama em blocos do circuito de estimulação, é apresentado na Figura 2.8 (secção B). Esta secção consiste de um estimulador elétrico de corrente, que permite o ajuste da forma (pulsos retangulares, mono ou bipolares), duração (50 μ s a 150 ms) e intensidade (0 a 5,5 mA) do estímulo. O sinal de disparo enviado pelo microcomputador é transmitido ao estimulador por

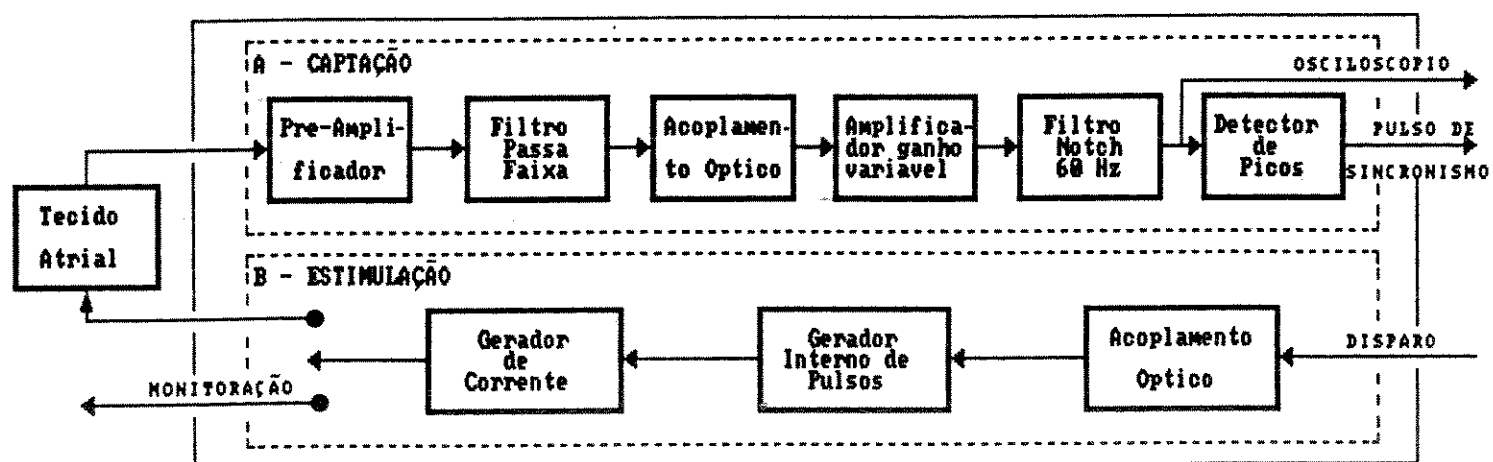


Figura 2.8 - Unidade isolada de captação/estimulação (UICE). (A) diagrama em blocos do circuito de captação; (B) diagrama em blocos do circuito de estimulação.

meio de acoplamento óptico. Deste modo, o estimulador que é alimentado a bateria (± 15 V), estará eletricamente isolado do circuito da rede e dos demais equipamentos porventura utilizados em conjunto.

Os estímulos são produzidos pelo gerador de pulsos, sob comando do sinal de disparo enviado pelo microcomputador. O gerador de corrente transforma os pulsos de tensão produzidos pelo gerador interno, em pulsos de corrente, os quais são aplicados ao tecido cardíaco. Os estímulos podem ser alternativamente aplicados a um resistor (1 kOhm), para que sua amplitude e duração possam ser ajustadas. Como saída para monitoração é produzido um pulso de tensão proporcional ao estímulo de corrente gerado.

2.4.3.2 "Software"

As rotinas de "software" foram escritas na linguagem "Assembly" do microprocessador INTEL 8085A. O diagrama em blocos apresentado na Figura 2.9, ilustra a estrutura do "software" implementado. O "software" está dividido em três níveis: rotina de inicialização (nível 0), rotina de seleção de tarefas (nível 1) e rotinas para cada tarefa (e.g. determinação do TRNS, apresentação de resultados), a serem selecionadas pelo usuário (nível 2). No nível 0 uma rotina principal declara blocos comuns, inicializa variáveis, define áreas de interrupção, de trabalho e de armazenamento de dados. Este nível é acessado

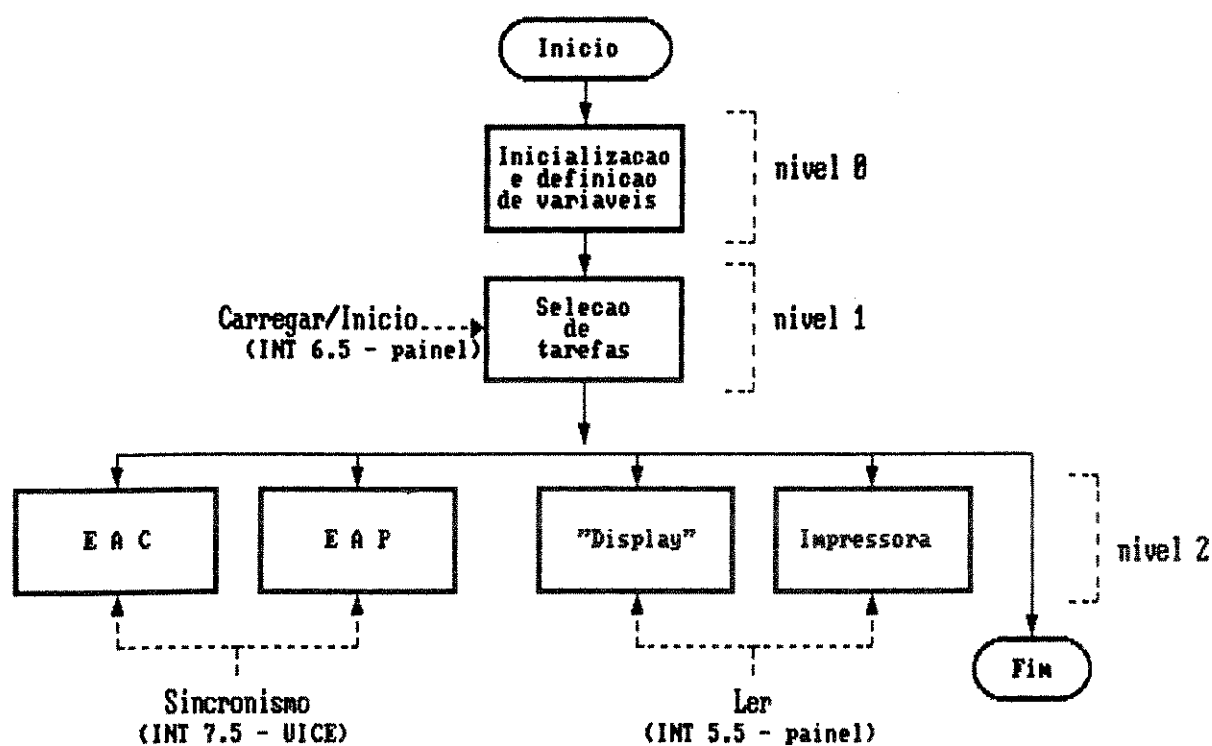


Figura 2.9 - Diagrama em blocos da estrutura do "software" implementado. O nível 0 é acessado quando o sistema é ligado ou após "reset". No nível 1, a rotina de seleção de tarefas, permite a interação do usuário com o sistema. No nível 2, estão os programas aplicativos básicos armazenados em memória (EPROM). Os sinais de controle que atuam em cada nível são apresentados (setas com linhas tracejadas).

quando o instrumento é ligado ou após "reset" do sistema. No nível 1, a rotina de seleção de tarefas, permite a interação do usuário com o sistema. Pressionando a chave Carregar/Início, no painel de controle, e colocando o código da tarefa (número decimal), o qual é visualizado no "display" numérico, a tarefa desejada é selecionada pelo usuário. No nível 2, dois métodos para determinação do TRNS podem ser acessados sob controle do sinal de sincronismo fornecido pela UICE. Neste nível, outras duas rotinas foram implementadas, sendo uma para apresentação de resultados através do "display" numérico do painel de controle, e outra para impressão de resultados.

2.4.3.3 Operação

Nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, são apresentados, respectivamente, os algoritmos para as rotinas de seleção de tarefas, e para determinação do TRNS pelos métodos da EAC e EAP. As interrupções de "hardware" utilizadas para controlar o fluxo do algoritmo, são também indicadas.

A seleção das tarefas (programas aplicativos armazenados em EPROM), é realizada através de códigos numéricos decimais, apresentados no "display" do painel de controle, sob comando das interrupções de "hardware" 5.5 (L) e 6.5 (C/I) do microprocessador (Tabela 2.1).

Para determinação do TRNS foram implementados dois métodos: o método da estimulação atrial contínua (EAC) e o método

TABELA 2.1 - Algoritmo simplificado da rotina de seleção de tarefas.

Interrupção	Passo	Descrição
C/I (INT 6.5)	1	C/I acionada pela primeira vez;
	2	signalizar operação carregar;
	3	esperar o usuário carregar no "display" numérico o código da tarefa desejada (nº decimal);
C/I (INT 6.5)	4	C/I acionada pela segunda vez;
	5	ler as portas A e B da interface paralela que contém o código da tarefa selecionada;
	6	calcular o endereço da tarefa selecionada e desviar para o seu endereço;
Sincronismo (INT 7.5)/ L (INT 5.5)	7	signalizar a operação início;
	8	a tarefa é sinalizada e sua execução fica sob controle do sinal de sincronismo quando se tratar de um dos métodos para determinação do TRNS, ou do sinal L quando se tratar da apresentação de resultados.

da estimulação atrial prematura (EAP). No método da EAC (Tabela 2.2), após um determinado período de estimulação contínua (5, 15, 30, 60, 120 ou 180 s), em uma dada frequência (300, 340, 380, 420, 460, 500, 540, 580, 620, 660 ou 700 estímulos/min.) superior à frequência espontânea, o TRNS é determinado como o intervalo (ms) entre a última despolarização provocada por estimulação externa, e a próxima despolarização atrial espontânea (vide Figura 2.6). No método da EAP (Tabela 2.3), um estímulo extra com prematuridade variável (5 a 95% do intervalo espontâneo médio) é aplicado após uma despolarização atrial espontânea. O TRNS neste caso, é o intervalo (ms) entre a despolarização provocada pelo estímulo extra, e a próxima atividade atrial espontânea (vide Figura 2.5).

O tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido ($TRNSc = TRNS$ menos intervalo espontâneo médio), é calculado em ambos os métodos.

TABELA 2.2 - Algoritmo simplificado do método da estimulação atrial contínua para determinação do TRNS.

Interrupção	Passo	Descrição
C/I (INT 6.5)	1	ler período de estimulação e frequência;
Sincronismo (INT 7.5)	2	calcular e armazenar em memória o intervalo médio (IEM) de 8 despolarizações espontâneas;
	3	realizar estimulação contínua até o fim do período de estimulação selecionado;
	4	produzir atraso de 75 ms para evitar artefato de estímulo;
Sincronismo (INT 7.5)	5	medir e armazenar em memória o TRNS e oito intervalos espontâneos seguintes;
	6	calcular e armazenar em memória o tempo de recuperação corrigido: $TRNSc = TRNS - IEM$;
	7	habilitar interrupções 6.5(C/I) 5.5 (L);
	8	halt.

TABELA 2.3 - Algoritmo simplificado do método da estimulação atrial prematura para determinação do TRNS.

Interrupção	Passo	Descrição
C/I (INT 6.5)	1	ler prematuridade (P) como % do intervalo espontâneo médio;
Sincronismo (INT 7.5)	2	calcular e armazenar em memória o intervalo médio (IEM) de 8 despolarizações espontâneas;
	3	calcular a prematuridade em ms a partir de IEM e P;
	4	aplicar o estímulo extra na prematuridade escolhida;
	5	produzir atraso de 75 ms para evitar artefato de estímulo;
Sincronismo (INT 7.5)	6	medir e armazenar em memória o TRNS e oito intervalos espontâneos seguintes;
	7	calcular e armazenar em memória o tempo de recuperação corrigido: $TRNSc = TRNS - IEM$;
	8	se existe outro estímulo a ser aplicado, entrar no período de repouso (60 s) para estabilização e retornar para o passo 1;
	9	habilitar interrupções 6.5(C/I) e 5.5 (L);
	10	halt.

2.5 Protocolos experimentais

Para ilustrar a aplicação da metodologia e instrumentação desenvolvidas, foi determinado o tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS) in vitro, e efetuada a comparação do método da estimulação atrial contínua (EAC) com o método da estimulação atrial prematura (EAP). Além disso, foi estudada a influência dos parâmetros estimulatórios (amplitude, tempo e frequência de estimulação), o efeito do bloqueio de receptores autonômicos, da concentração extracelular de cloreto de potássio e dos neurotransmissores autonômicos, noradrenalina e acetilcolina, sobre o TRNS.

2.5.1 Comparação dos métodos da EAC e EAP para determinação do TRNS

Após 40 minutos de estabilização em solução de Krebs-Henseleit, o TRNS foi medido usando o método da EAP. Diferentes intervalos de estimulação (IE) (25% a 80% do intervalo espontâneo médio) foram testados. Um novo período de estabilização (20 min.) foi observado e o TRNS foi medido novamente, usando o método da EAC. Neste caso, cinco diferentes frequências de estimulação (380, 460, 540, 620 e 700 est./min.) foram aplicadas durante 120 segundos cada, em intervalos de 5 minutos. Todos estímulos aplicados em ambos os métodos, foram pulsos de corrente (retangulares, bipolares), 5 ms de duração e amplitude 2x o limiar estimulatório.

2.5.2 Influência dos parâmetros estimulatórios sobre o TRNS

Foi estudado o efeito de três parâmetros estimulatórios: amplitude dos estímulos, tempo e frequência de estimulação. Estes parâmetros normalmente definem o protocolo clínico de estimulação para avaliação da função sinusal. Após 40 minutos de estabilização em solução de Krebs-Henseleit, o TRNS foi determinado a partir do método da estimulação atrial contínua (EAC). A estimulação foi realizada com pulsos de corrente (retangulares, bipolares), 5 ms de duração e amplitudes 1.2, 2.0 e 3.0 vezes a corrente limiar, por períodos de 5, 60 e 120 segundos, em três diferentes frequências (380, 540 e 620 est./min.).

2.5.3 Influência do bloqueio de receptores sobre o TRNS

Foi verificado o efeito do bloqueio de receptores beta adrenérgicos e colinérgicos muscarínicos, sobre o TRNS. Após o período de estabilização (40 min.) em solução de Krebs-Henseleit, valores de TRNS foram determinados, utilizando-se o método da estimulação atrial contínua (EAC), para cinco diferentes frequências estimulatórias (380, 460, 540, 620 e 700 est./min.), mantendo-se constante a amplitude do estímulo (2x o limiar) e o tempo de estimulação (120 s). Os estímulos foram pulsos de corrente (retangulares, bipolares), 5 ms de duração. O TRNS foi determinado antes e após um período de incubação (40 min.) em solução de Krebs-Henseleit na presença de atropina (100

nM) e propranolol (30 nM).

2.5.4 Efeito da concentração externa de cloreto de potássio ($[KCl]_0$) sobre o TRNS

Após um período de estabilização de 40 minutos, valores de TRNS foram determinados pelo método da EAC (380, 460, 540, 620 e 700 est./min., 120 s de estimulação), e a seguir, pelo método da EAP (prematuridade dos estímulos 45%, 50%, 55%, 65% e 80%), primeiramente em solução nutriente controle (Krebs-Henseleit) com atropina (100 nM) e propranolol (30 nM), e após lavagem da preparação e novo período de estabilização, em solução nutriente com atropina e propranolol onde a $[KCl]_0$ foi aumentada para 6,1 mM ou reduzida para 3,1 mM. Uma curva concentração-efeito ($[KCl]_0$ -TRNSc) foi também obtida, utilizando o método da EAC (620 est./min., 120 s). O TRNS foi determinado para as seguintes concentrações de KCl: 1,6, 1,9, 2,8, 4,6, 6,4, 7,3 e 7,6 mM. A estimulação foi realizada com pulsos de corrente (retangulares, bipolares), 5 ms de duração e amplitude 2x o limiar.

2.5.5 Efeito da acetilcolina (ACh) e noradrenalina (NA) sobre o TRNS

Para avaliar o efeito dos neurotransmissores (ACh e NA) sobre o TRNS, foi usado o método da estimulação atrial contínua (EAC) após um período de estabilização (40 min.) em

solução de Krebs-Henseleit. Neste caso, os estímulos, pulsos de corrente (retangulares, bipolares, 5 ms de duração e amplitude 2x o limiar), foram aplicados à preparação durante 120 s, na frequência de 420 est./min.. NA ou Ach foi adicionada à solução do banho, e após um período de contato de 2 minutos, o TRNS foi determinado novamente. Três diferentes concentrações cumulativas de NA (10, 30 e 100 nM) e Ach (1, 3 e 10 μ M), foram aplicadas na mesma preparação.

Em experimentos adicionais a velocidade de condução, no átrio direito isolado de rato, foi determinada utilizando-se a preparação descrita anteriormente. Estimulando-se o tecido atrial com eletrodos localizados a diferentes distâncias do eletrodo de captação, obtem-se uma resposta defasada no tempo. Medindo-se a defasagem (Δt) e conhecendo-se a distância (Δd) entre os eletrodos de estimulação, tem-se a velocidade de condução por:

$$v = \Delta d / \Delta t$$

Estímulos extras, com duração e amplitude mínimas, necessárias para provocar a resposta do tecido cardíaco com o menor artefato de estímulo, foram aplicados sempre no meio do intervalo diastólico atrial espontâneo.

Em alguns experimentos, a velocidade de condução da onda de excitação, gerada por estimulação artificial, no tecido atrial foi determinada na presença de Ach (10 μ M e 50 μ M).

2.6 Análise estatística

Os valores de TRNS obtidos em diferentes combinações dos três parâmetros estimulatórios (amplitude, duração e frequência), e também aqueles determinados na presença de atropina (100 nM) mais propranolol (30 nM), foram comparados por análise de variância bi e trifatorial (Keppel, 1982).

Os valores de TRNS obtidos a partir dos métodos da EAC e da EAP, e aqueles determinados na presença de noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh), foram comparados por análise de variância bifatorial e teste "t" para comparações ortogonais (Keppel, 1982). Retas de regressão linear foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados.

Os valores de TRNS obtidos a partir dos métodos da EAC e da EAP, na ausência e na presença de aumento ou diminuição da $[KCl]_0$, foram comparados por análise de variância trifatorial e teste "t" para comparações ortogonais (Keppel, 1982).

Os valores de TRNS obtidos a partir do método da EAC na presença de diferentes concentrações de KCl, foram comparados por análise de variância monofatorial (Keppel, 1982).

Valores de "P" iguais ou menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS DA APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

3.1 Comparação entre os métodos da EAC e EAP para determinação do TRNS

Retas de regressão para a relação entre o intervalo de estimulação (IE) e TRNSc, obtido pelos métodos da EAC e EAP, são apresentados na Figura 3.1. Foi encontrada uma correlação negativa ($P < 0,001$) entre TRNSc e intervalo de estimulação (frequência⁻¹) no método da EAC, enquanto, para o método da EAP, os valores de TRNSc permaneceram constantes em prematuridades de estímulo variando de 25% a 80% do intervalo espontâneo médio (IEM). A Tabela 3.1 ilustra os valores de TRNSc, obtidos nos correspondentes intervalos de estimulação para ambos os métodos, como também os valores de TRNSc relativos ao IEM. A análise de variância bifatorial revelou que os valores de TRNSc foram significativamente dependentes do método usado ($P < 0,001$). O método da EAC produzindo maiores valores de TRNSc ($P < 0,05$) em intervalos de estimulação na faixa de 45% a 55% do IEM. Os valores de IEM medidos antes de cada determinação de TRNSc permaneceram constantes durante o experimento.

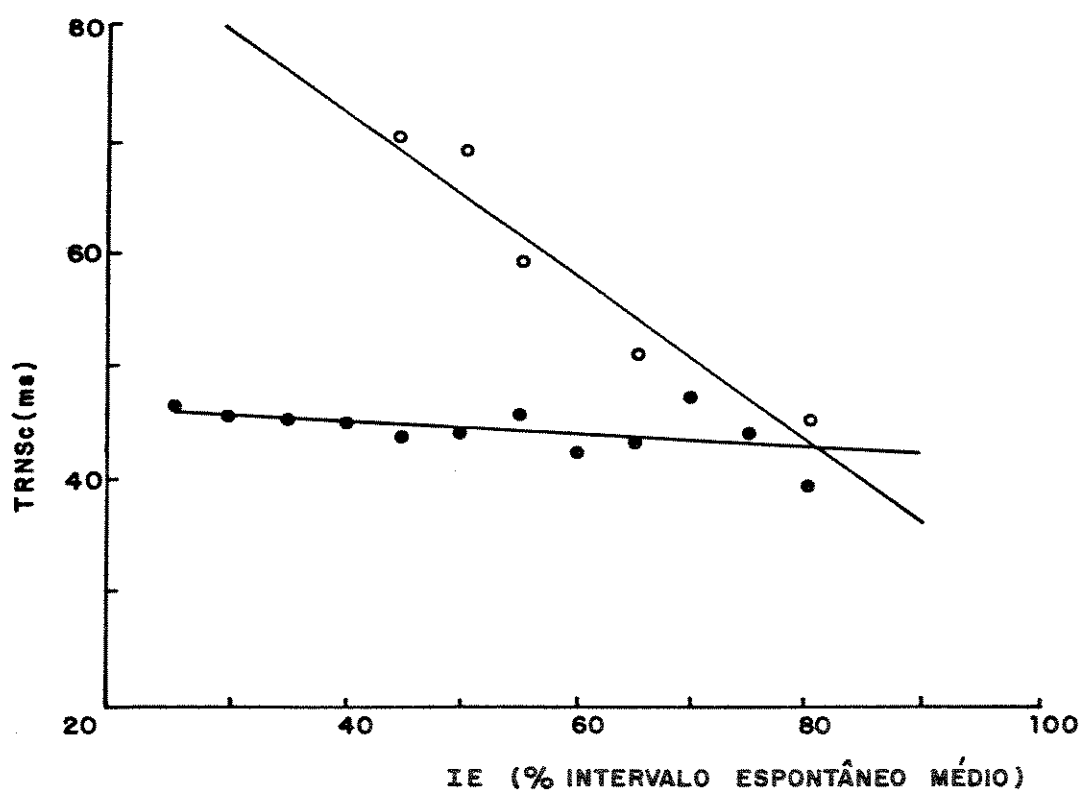


Figura 3.1 - Relação entre intervalo de estimulação (IE, como porcentagem do IEM) e tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido (TRNSc), obtidos através dos métodos da estimulação atrial contínua (EAC) e estimulação atrial prematura (EAP) em átrio direito isolado de rato. O intervalo de estimulação foi calculado da frequência de estimulação (EAC) ou da prematuridade do estímulo (EAP). No método da EAC, (O), $Y = 101,59 - 0,71x$; coeficiente de correlação = $-0,67$, $P < 0,001$; $n=30$. No método da EAP, (●), $Y = 47,5 - 0,06x$; coeficiente de correlação = $-0,13$, $P < 0,05$; $n=72$.

TABELA 3.1 - Tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido (TRNSc) determinado em átrio direito isolado de rato, a partir dos métodos da estimulação atrial contínua (EAC) e estimulação atrial prematura (EAP) em diferentes intervalos de estimulação. Os dados são apresentados como MÉDIA $\pm$ EPM (ms). O TRNSc relativo $[(\text{TRNSc} + \text{IEM})/\text{IEM}]$ foi calculado em ambos os métodos. IEM= intervalo espontâneo médio. n=6.

Intervalo de estimulação (% IEM)	EAC		EAP		
	TRNSc (ms)	TRNSc relativo	TRNSc (ms)	TRNSc relativo	
45	69,8 $\pm$ 8,3	1,34	44,7 $\pm$ 3,8	1,22	*
50	69,3 $\pm$ 3,4	1,34	44,3 $\pm$ 3,9	1,22	*
55	59,7 $\pm$ 1,3	1,29	45,7 $\pm$ 2,9	1,23	*
65	50,8 $\pm$ 1,2	1,25	43,2 $\pm$ 3,3	1,21	
80	45,2 $\pm$ 3,1	1,22	39,3 $\pm$ 1,9	1,19	
IEM (ms)	200,8 $\pm$ 3,7		201,2 $\pm$ 4,2		

* diferença estatisticamente significante (P<0,05) entre métodos

3.2 Influência dos parâmetros estimulatórios sobre o TRNS

Na Tabela 3.2 e na Figura 3.2 são apresentados os valores de TRNSc obtidos para diferentes combinações dos três parâmetros estimulatórios: amplitude do estímulo, tempo e frequência de estimulação. A análise de variância trifatorial revelou que apenas a frequência de estimulação afetou significativamente o TRNSc ($F=4,76$; $DF=2-135$; $P < 0,05$). Nenhuma interação significativa dos parâmetros estimulatórios foi detectada.

TABELA 3.2 - Influência dos parâmetros estimulatórios (amplitude, tempo e frequência) sobre o TRNSc determinado em átrio direito isolado de rato. A análise de variância indicou um efeito significativo da frequência de estimulação ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como MÉDIA $\pm$ EPM (ms). $n=6$.

Estimulação		Frequência de estimulação (estímulos/min.)		
Amplitude (x corrente limiar)	Tempo (s)	380	500	620
1,2	5	31,3 $\pm$ 5,2	34,8 $\pm$ 7,5	46,3 $\pm$ 3,8
	60	39,5 $\pm$ 6,2	44,0 $\pm$ 4,3	48,7 $\pm$ 6,6
	120	40,7 $\pm$ 5,9	45,3 $\pm$ 4,4	63,5 $\pm$ 6,8
2,0	5	36,5 $\pm$ 4,9	36,0 $\pm$ 4,9	47,0 $\pm$ 5,6
	60	39,2 $\pm$ 6,6	48,7 $\pm$ 13,7	50,0 $\pm$ 8,1
	120	41,8 $\pm$ 8,2	52,2 $\pm$ 15,2	64,0 $\pm$ 18,5
3,0	5	45,8 $\pm$ 8,1	47,5 $\pm$ 10,4	52,0 $\pm$ 12,8
	60	45,7 $\pm$ 7,8	44,7 $\pm$ 9,1	61,7 $\pm$ 19,2
	120	48,8 $\pm$ 8,4	51,8 $\pm$ 8,2	64,2 $\pm$ 15,7

Nº EXPERIMENTOS = 6

○—○ TEMPO DE ESTIMULAÇÃO = 5"

△---△ TEMPO DE ESTIMULAÇÃO = 1'

□—□ TEMPO DE ESTIMULAÇÃO = 2'

$A_1 = 1,2 \times \text{LIMIAR}$

$A_2 = 2 \times \text{LIMIAR}$

$A_3 = 3 \times \text{LIMIAR}$

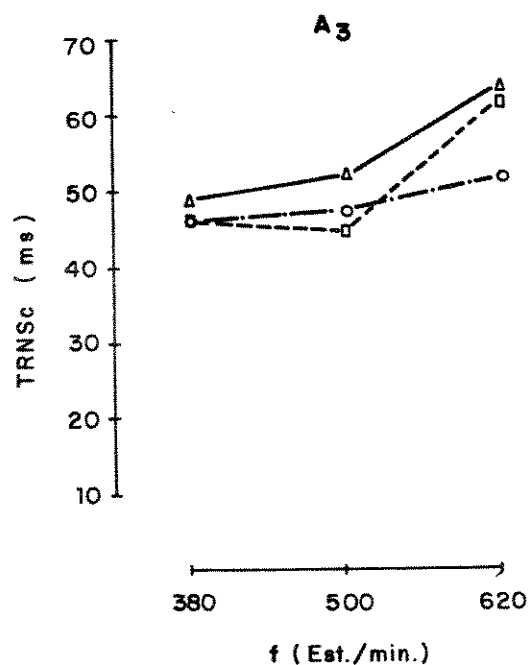
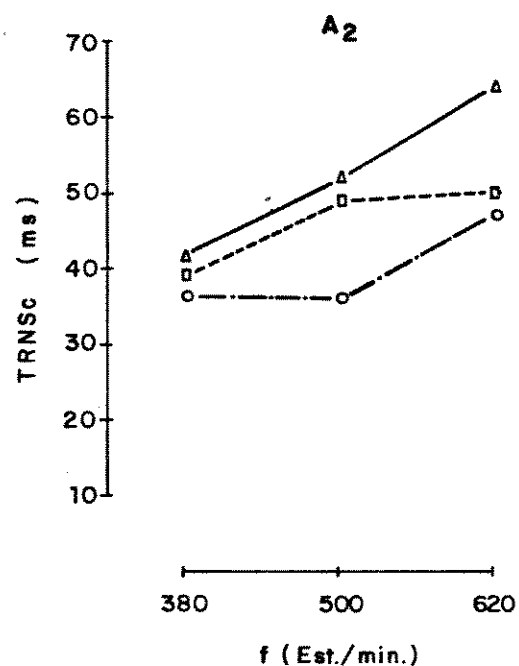
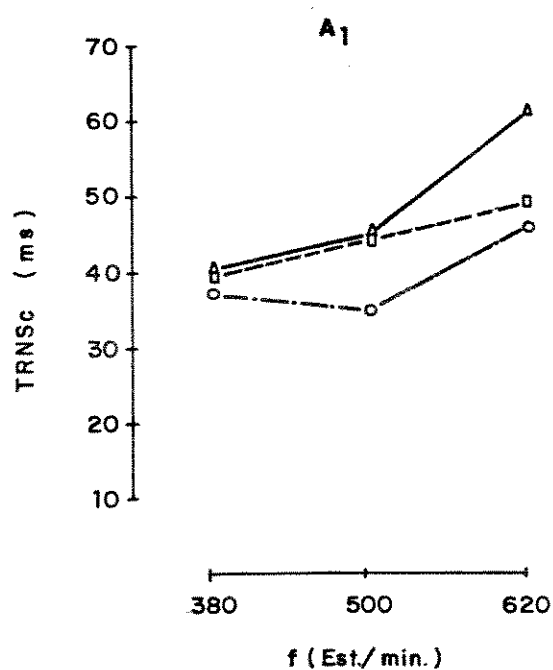


Figura 3.2 - Valores de TRNS determinados em diferentes combinações dos três parâmetros estimulatórios: amplitude, tempo e frequência de estimulação.

3.3 Influência do bloqueio de receptores autonômicos sobre o TRNS

A Tabela 3.3 e a Figura 3.3 ilustram valores de TRNSc obtidos para cinco diferentes frequências de estimulação na ausência e na presença de atropina (100 nM) mais propranolol (30 nM). O tratamento *in vitro* não afetou a frequência espontânea ($297 \pm 3,8$ e $293 \pm 3,3$ batimentos/min., nas condições não-tratada e tratada respectivamente). A análise de variância bifatorial revelou uma relação frequência-TRNSc ($F=4,86$; $DF=4-89$; $P<0,01$) significativa. Além disso, o tratamento com atropina mais propranolol não afetou o TRNSc nem a relação frequência-TRNSc.

TABELA 3.3 -Influência da frequência de estimulação e bloqueio de receptores autonômicos sobre o tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido (TRNSc), determinado em átrio direito isolado de rato. Experimentos realizados na ausência e na presença de atropina (100 nM) e propranolol (30 nM). A análise de variância indicou um significativo efeito da frequência de estimulação ($P<0,01$). Os dados são apresentados como MÉDIA $\pm$ EPM (ms). $n=10$.

Tratamento in vitro	Frequência de estimulação (estímulos/min.)				
	380	460	540	620	700
nenhum	$41,5 \pm 4,7$	$46,0 \pm 4,9$	$53,2 \pm 5,0$	$60,2 \pm 5,8$	$52,1 \pm 9,3$
A + P	$39,4 \pm 2,5$	$45,5 \pm 3,8$	$53,9 \pm 5,1$	$64,1 \pm 5,2$	$58,0 \pm 5,6$

A= atropina; P= propranolol

Nº EXPERIMENTOS = 10

O—O KREBS HENSELEIT

X--X KREBS HENSELEIT + ATROPINA + PROPRANOLOL

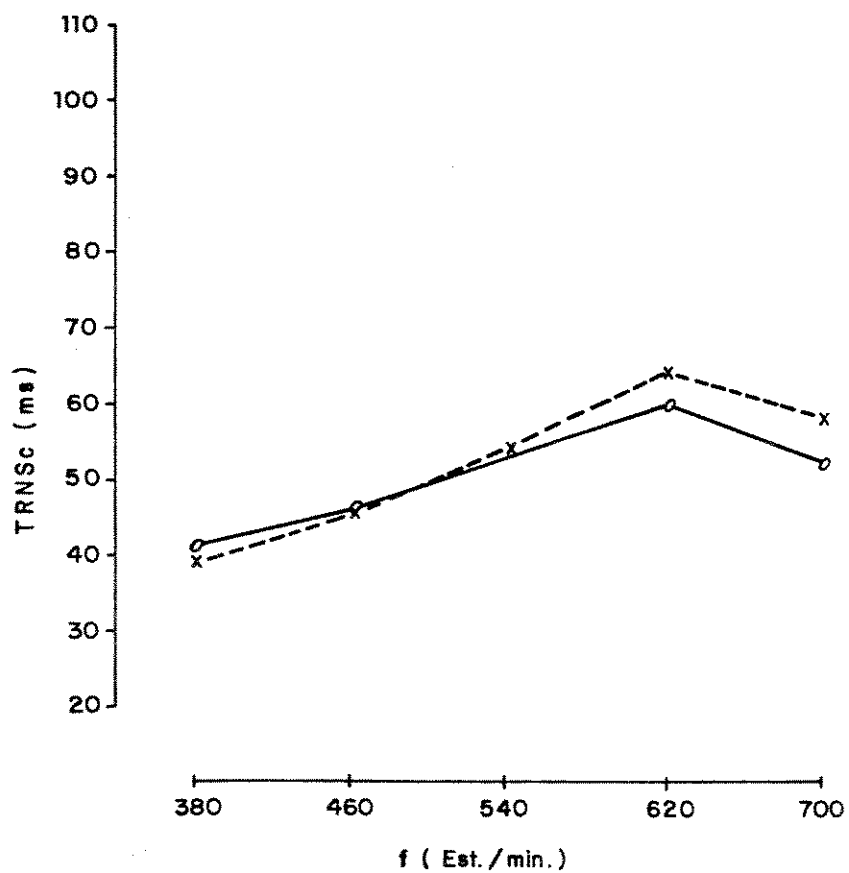


Figura 3.3 - Relação frequência-TRNSc em tecido atrial direito isolado de rato. (X) Krebs-Henseleit + atropina (100 nM) + propranolol (30 nM), (O) Krebs-Henseleit normal.

3.4 Efeito da $[KCl]_0$ sobre o TRNS

Na Tabela 3.4 e na Figura 3.4 são apresentados os valores TRNSc obtidos em diferentes condições: controle ($[KCl]_0 = 4,6$ mM), alta $[KCl]_0 = 6,1$ mM ($\uparrow KCl$) e baixa $[KCl]_0 = 3,1$ mM ($\downarrow KCl$). A análise de variância revelou, que não importando a concentração de KCl, os valores de TRNSc obtidos pelos dois métodos (EAC e EAP) são diferentes ($P < 0,01$). O método da EAC apresentou valores maiores para o TRNSc. Nas condições controle e $\downarrow KCl$, foi detectada uma interação intervalo de estimulação IE - método significativa ($P < 0,01$). Neste caso, a diferença foi devido a relação positiva entre frequência de estimulação e TRNSc encontrada no método da EAC, em oposição ao método da EAP, no qual o TRNSc foi independente do intervalo de estimulação.

Embora a diferença entre os métodos tenha persistido para $\uparrow KCl$, a interação IE-método não foi estatisticamente significante. Neste caso, os valores de TRNSc, no método da EAP, aumentaram à medida que a prematuridade de estímulo foi aumentada, acompanhando a relação IE-TRNSc obtida no método da EAC. De modo geral, o TRNSc aumentou em $\uparrow KCl$ ($P < 0,01$) e não foi alterado em $\downarrow KCl$. A análise de contrastes ortogonais indicou que os métodos da EAC e EAP não foram diferentes em intervalos de estimulação próximos ao intervalo espontâneo médio (65% e 80% no controle e $\uparrow KCl$, ou 55%, 65% e 80% em $\downarrow KCl$). Em três experimentos adicionais, nos quais a $[KCl]_0 = 1,6$ mM, foi confirmada a tendência de transformar o TRNSc independente de

IE, à medida que a $[KCl]_0$ é diminuída. Neste caso, para IE na faixa de 45% a 80% do IEM não houve alteração significativa dos valores de TRNSc.

TABELA 3.4 - Valores TRNSc determinados em átrio direito isolado de rato, a partir dos métodos de estimulação atrial contínua (EAC) e estimulação atrial prematura (EAP), em presença de modificações da concentração de KCl (controle = 4,6 mM, $\uparrow KCl$ = 6,1 mM e $\downarrow KCl$ = 3,1 mM). A análise de variância revelou que $\uparrow KCl$ aumentou o TRNSc ($P<0,01$) e modificou a relação IE-TRNSc ($P<0,01$), enquanto que $\downarrow KCl$ não modificou o TRNSc. Os métodos da EAC e EAP foram diferentes ($P<0,01$) não importando a $[KCl]_0$, exceto para intervalos de estimulação próximos ao IEM. Os dados são apresentados como MÉDIA $\pm$ EPM. n=6.

IE (% IEM)	Controle		$\downarrow KCl$		$\uparrow KCl$	
	EAC	EAP	EAC	EAP	EAC	EAP
45	75,1 $\pm$ 5,9	48,5 $\pm$ 3,6	75,0 $\pm$ 5,1	48,0 $\pm$ 5,2	92,0 $\pm$ 17,4	67,0 $\pm$ 7,9
50	70,5 $\pm$ 4,3	46,9 $\pm$ 3,4	73,0 $\pm$ 5,8	49,0 $\pm$ 5,4	97,0 $\pm$ 13,4	65,5 $\pm$ 7,3
55	58,2 $\pm$ 4,1	46,7 $\pm$ 3,7	53,5 $\pm$ 6,4	46,0 $\pm$ 5,1	86,0 $\pm$ 12,8	63,0 $\pm$ 6,5
65	48,5 $\pm$ 3,1	46,1 $\pm$ 3,5	52,0 $\pm$ 6,5	47,0 $\pm$ 4,2	66,5 $\pm$ 7,4	59,0 $\pm$ 3,2
80	47,5 $\pm$ 2,2	39,7 $\pm$ 1,9	52,0 $\pm$ 5,7	41,0 $\pm$ 3,1	60,0 $\pm$ 6,3	46,0 $\pm$ 1,7

IE = intervalo de estimulação; IEM = intervalo espontâneo médio

Na Tabela 3.5 e na Figura 3.5 são apresentados valores de TRNSc obtidos a partir do método da EAC (620 est./min., 2 min.) na presença de diferentes valores de $[KCl]_0$. A análise de variância monofatorial mostrou que os valores de TRNSc

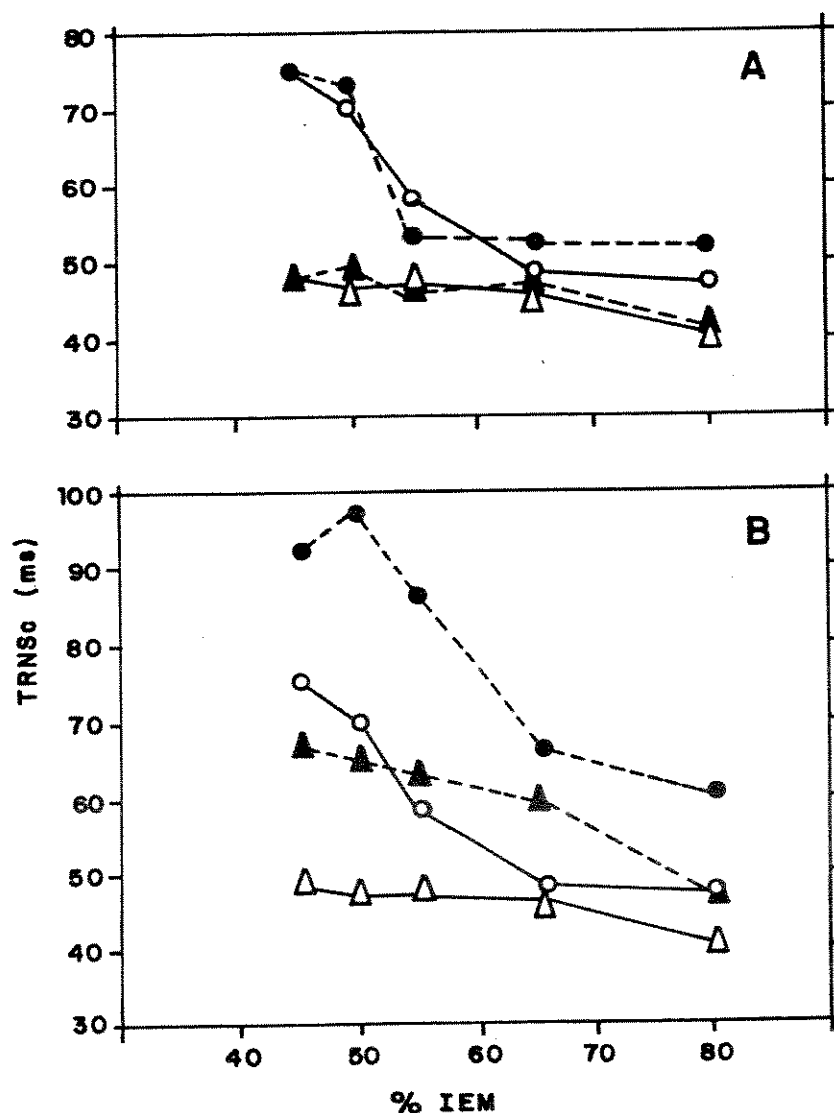


Figura 3.4 - Influência da concentração extracelular de KCl sobre o tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS) in vitro. Abcissa: intervalo de estimulação como porcentagem do intervalo espontâneo médio (IEM). ordenada: tempo de recuperação do nódulo sinusal corrigido (TRNSc) obtido a partir dos métodos da estimulação atrial contínua (círculos) e estimulação atrial prematura (triângulos), determinados em átrio direito isolado de rato na presença de 3,1 (●, ▲, secção A), 4,6 (○, △, secções A e B) e 6,1 (●, ▲, secção B) mM de KCL.

determinados na presença de incrementos da $[KCl]_O$ para 6,4, 7,3 e 7,6 mM, a partir do controle (4,6 mM), foram significativamente maiores ($P < 0,05$), enquanto que em $[KCl]_O$ menores que o controle (1,6, 1,9 e 2,8 mM), os valores de TRNSc não foram diferentes do controle.

TABELA 3.5 - Valores TRNSc (MÉDIA $\pm$ EPM em ms) obtidos em átrio direito isolado de rato, a partir do método da estimulação atrial contínua (620 estímulos/min., 120 s) em diferentes concentrações de KCL ($[KCl]_O$). A análise de variância monofatorial revelou que em $[KCl]_O$ abaixo do controle os valores TRNSc não foram estatisticamente diferentes, enquanto que em $[KCl]_O$ acima do controle o TRNSc aumentou significativamente ($P < 0,01$). n=7.

Concentração KCl (mM)	TRNSc (ms)
1,6	65,0 $\pm$ 6,45
1,9	66,0 $\pm$ 6,13
2,8	65,0 $\pm$ 7,55
4,6 (controle)	81,0 $\pm$ 7,55
6,4	104,0 $\pm$ 8,55
7,3	134,0 $\pm$ 13,31
7,6	124,0 $\pm$ 8,45

3.5 Efeito dos neurotransmissores noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh) sobre o TRNS

A Tabela 3.6 e a Figura 3.6 ilustram os efeitos da noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh) sobre IEM, TRNS e TRNSc (TRNSc = TRNS - IEM). Dentro da faixa de doses usada, ambos NA e

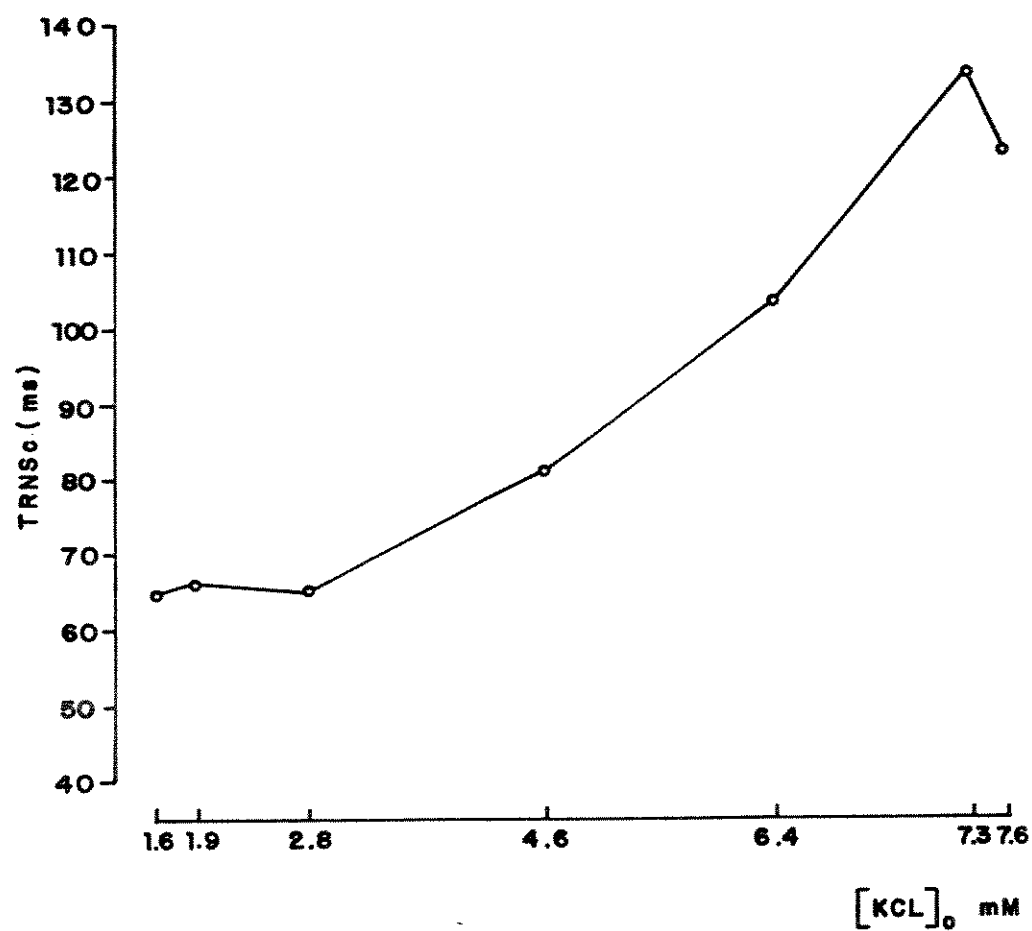


Figura 3.5 - Curva $[KCL]_0$ -TRNSc, ilustrando o efeito da concentração extracelular de KCl sobre o tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido (TRNSc), determinado a partir do método da estimulação atrial contínua (EAC), em átrio direito isolado de rato.

ACh exerceram efeito cronotrópico significantivo ($P < 0,001$), a NA diminuindo e a ACh aumentando o IEM de modo dose-dependente. O mesmo efeito foi observado para o TRNS. Porém, os valores de TRNSc não foram afetados pela NA. Como ilustrado na Figura 3.7, o TRNSc não acompanha as variações de IEM na presença do agonista adrenérgico (NA). Por outro lado, na presença da ACh, uma pequena, porém significativa correlação positiva ($P < 0,05$) entre TRNSc e IEM foi observada.

TABELA 3.6 - Valores de intervalo espontâneo médio (IEM) e tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS e TRNSc, determinados a partir do método da EAC) obtidos em átrio direito isolado de rato, na ausência e na presença de diferentes concentrações de noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh). Os dados são apresentados como MÉDIA $\pm$ EPM (ms). n=6.

Fármaco	Concentração (μ M)	IEM (ms)	TRNS (ms)	TRNSc (ms)
NA	0,00	196,0 $\pm$ 3,4	240,2 $\pm$ 4,8	44,2 $\pm$ 4,1
	0,01	187,2 $\pm$ 6,1	232,2 $\pm$ 7,6	45,0 $\pm$ 2,7
	0,03	169,2 $\pm$ 5,7	219,5 $\pm$ 7,6	50,3 $\pm$ 4,8
	0,10	156,0 $\pm$ 5,8	202,0 $\pm$ 7,3	48,5 $\pm$ 4,3
ACh	0,00	204,2 $\pm$ 2,8	253,5 $\pm$ 4,7	49,3 $\pm$ 4,6
	1,00	236,7 $\pm$ 11,1	296,0 $\pm$ 14,7	59,3 $\pm$ 4,9
	3,00	248,7 $\pm$ 10,9	307,2 $\pm$ 12,7	58,5 $\pm$ 5,0
	10,00	268,3 $\pm$ 12,0	333,7 $\pm$ 15,6	65,5 $\pm$ 7,4

A velocidade de condução atrial apresentou redução

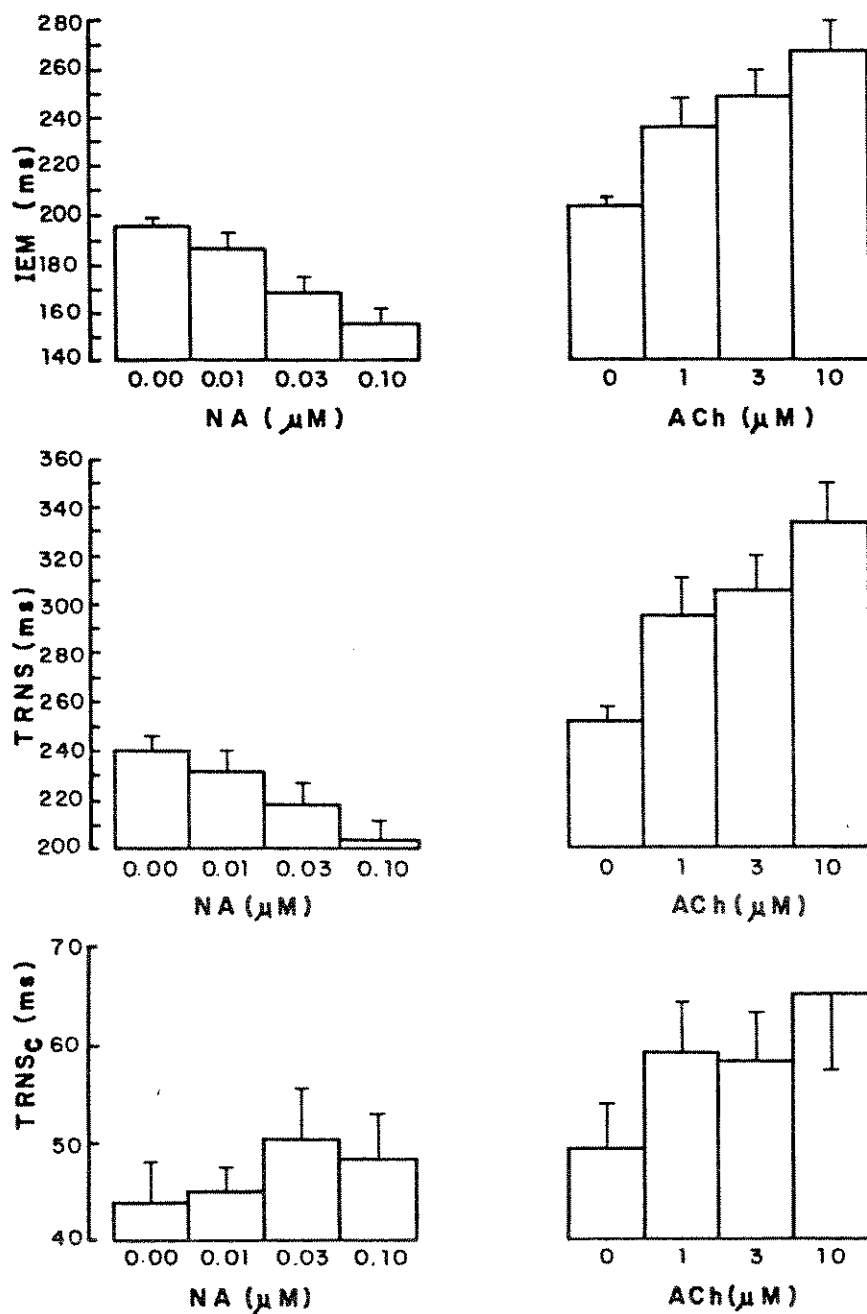


Figura 3.6 - Efeito da noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh) sobre o intervalo espontâneo médio (IEM), o tempo de recuperação do nódulo sinusal (TRNS) e TRNS corrigido ($\text{TRNSc} = \text{TRNS} - \text{IEM}$), determinados em átrio direito isolado de rato.

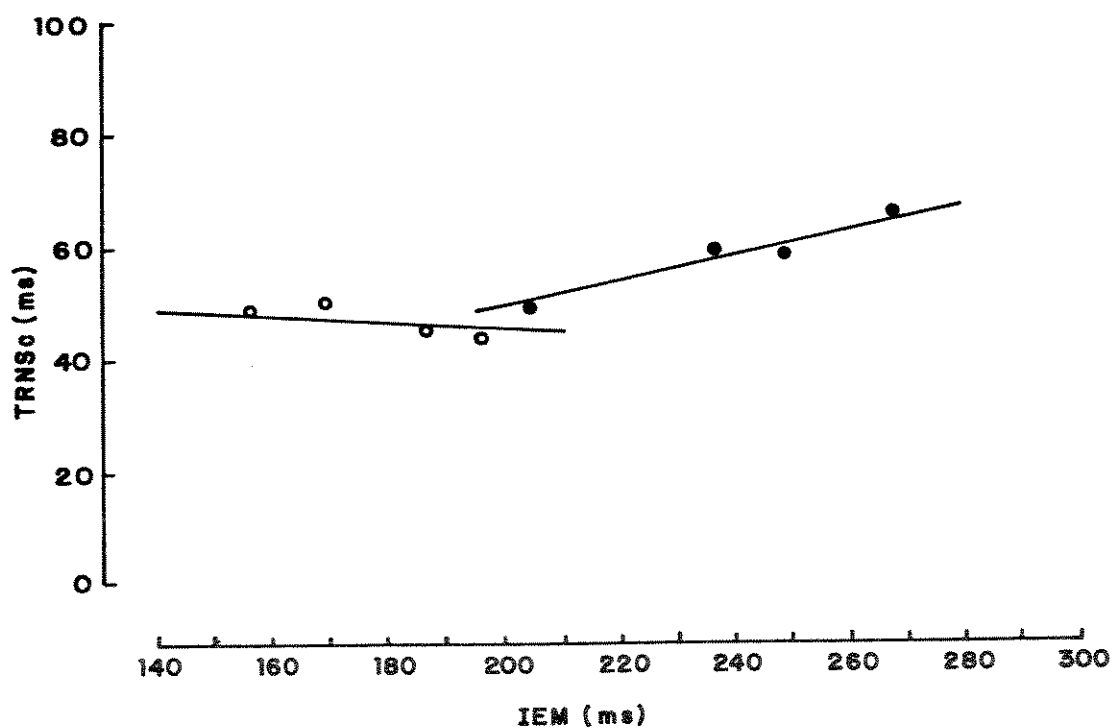


Figura 3.7 - Relação entre intervalo espontâneo médio (IEM) e tempo de recuperação do nóculo sinusal corrigido (TRNSc), obtidos a partir do método da EAC em átrio direito isolado de rato, exposto a diferentes concentrações de noradrenalina (NA) e acetilcolina (ACh). Para NA, (O), $Y = 56,40 - 0,05x$; coeficiente de correlação = $-0,11$, $P < 0,05$; $n=24$. Para ACh, (●), $Y = 6,48 + 0,22x$; coeficiente de correlação = $0,50$; $n=24$.

significativa ($P < 0,01$) e dose dependente na presença de ACh (controle: $67,5 \pm 4,1$ cm/s; ACh 10 μ M: $47,9 \pm 3,7$ cm/s; ACh 50 μ M: $37,2 \pm 1,2$ cm/s).

4. DISCUSSÃO

A metodologia desenvolvida neste trabalho possibilitou que os principais parâmetros (TRNS, TRNSc, intervalo espontâneo médio) frequentemente utilizados para avaliação clínica da função do NS (Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972; Tonkin & Heddle, 1984) pudessem ser determinados por meio de diferentes métodos, e em diferentes condições experimentais. Embora esta metodologia não permita o estabelecimento preciso de características particulares do NS em função do método empregado para sua avaliação, o modelo experimental utilizado apresentou características similares (vide item 3.1) às observadas por outros autores em experimentos in vitro e in vivo (Bonke et al., 1969 e 1971; Strauss et al., 1973; Kerin et al., 1983). Além disso, a metodologia desenvolvida poderá ser utilizada para o desenvolvimento e teste de novos modelos animais para estudo da disfunção do NS.

O sistema de instrumentação desenvolvido, composto por uma unidade isolada de captação/estimulação (UICE) e um microcomputador dedicado (MD), permitiu a detecção e processamento do sinal elétrico correspondente à atividade elétrica atrial, possibilitando uma determinação precisa, reproduzível e fácil do TRNS, além da possibilidade de documentação dos principais resultados (vide apêndice). Por outro lado, embora o sistema de instrumentação apresentado neste trabalho seja de construção e operação relativamente fáceis e

apresente um custo razoavelmente baixo (aproximadamente US\$ 120), ele é dedicado e exige reprogramação da EPROM para modificação de suas funções. Este problema poderia ser contornado conectando-se a UICE a um microcomputador convencional, o qual permitiria a programação em linguagens de alto nível, aumentando a flexibilidade do sistema e a variação dos protocolos de estimulação. Outra limitação que este sistema dedicado apresenta é a necessidade do conhecimento prévio, por parte do usuário, dos códigos decimais correspondentes às tarefas que o MD pode executar (e.g. determinação do TRNS, documentação dos resultados), uma vez que estas tarefas são acessadas por meio de um código decimal escolhido pelo usuário por meio do painel de controle do instrumento. Neste caso, o problema pode ser facilmente resolvido modificando-se o "hardware", de modo que o acesso às diferentes tarefas do MD seja realizado através de um teclado (Marques & Bassani, 1989b).

Dois métodos para determinação do TRNS foram implementados neste trabalho: o método da estimulação atrial contínua (EAC) e o método da estimulação atrial prematura (EAP). Em diversos trabalhos tem sido mostrado que o TRNS, determinado a partir do método da EAC, depende da frequência, do tempo de estimulação (Lange, 1965; Lu et al., 1965; Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972) e da intensidade dos estímulos (Chadda et al., 1975; Kerin et al., 1983). Nestes trabalhos, a influência de um dado parâmetro sobre o TRNS foi avaliada enquanto que os outros eram mantidos constantes. Entretanto, a influência de um

determinado parâmetro pode depender do estado dos outros parâmetros, isto é, pode existir uma interação significativa (Kerin et al., 1983). Em apenas um pequeno número de trabalhos (Kerin et al., 1983; Neely et al., 1987), a interação destes parâmetros, os quais normalmente definem o protocolo clínico de estimulação para avaliação da função do NS, foi analisada.

No presente trabalho, observou-se a ausência de interação entre os parâmetros estudados (frequência, duração e intensidade), sugerindo que seus efeitos sobre o TRNSc sejam independentes (vide Figura 3.2), o que confirma os resultados obtidos in vivo por outros autores (Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972; Chadda et al., 1975; Kerin et al., 1983). Quando os três parâmetros foram analisados separadamente, apenas a frequência de estimulação afetou significativamente o TRNS e TRNSc (Marques et al., 1988).

Quando os valores de TRNSc, obtidos a partir dos métodos da EAC e EAP foram comparados, observou-se que, em determinados intervalos de estimulação (IE), calculados a partir da frequência de estimulação no método da EAC e da prematuridade do estímulo no método da EAP, os valores de TRNSc não foram estatisticamente diferentes. Este fato possibilita, em determinadas situações, a opção por um ou outro método. O método da EAP pode ser escolhido, por exemplo, no sentido de reduzir a corrente estimulatória total aplicada ao tecido cardíaco.

Os valores de TRNSc obtidos a partir do método da

EAP mantiveram-se constantes para prematuridades de estímulo variando de 25% a 80% do IEM. Isto parece ser devido ao fato de que nesta faixa de prematuridades, todo estímulo extra aplicado ao tecido atrial conduz-se retrogradamente e despolariza as células do NS, produzindo efeito de "reset" em todas as condições (Narula et al., 1972; Strauss et al., 1973; Tonkin & Heddle, 1984).

Valores de TRNS obtidos a partir dos métodos da EAC e da EAP in vivo em humanos foram previamente comparados por Narula et al (1972). Os resultados aqui obtidos, em átrio direito isolado de rato, apresentaram várias características similares àquelas observadas por Narula et al (1972) e outros autores (Mandel et al., 1971; Strauss et al., 1973; Dhingra et al., 1975; Strauss et al., 1976; Reiffel et al., 1982). No presente trabalho, os valores de TRNSc determinados pelo método da EAP não foram influenciados pelo IE, na mesma faixa de prematuridades observadas por aqueles autores. No método da EAC, por outro lado, foi encontrada uma relação positiva entre TRNSc e frequência de estimulação (Mandel et al., 1971; Marques et al., 1988; Marques & Bassani, 1989a). Quando o TRNS relativo ($[\text{TRNSc} + \text{IEM}]/\text{IEM}$) foi calculado, surgiu uma outra similaridade entre os resultados obtidos in vivo em humanos e aqueles aqui apresentados. O TRNS relativo calculado a partir dos dados apresentados por Narula et al (1972) e Strauss et al (1973) in vivo em humanos foram, respectivamente, 1,2 e 1,26. Como apresentado na Tabela 3.1, os valores obtidos in vitro foram aproximadamente iguais, sugerindo

que o modelo experimental *in vitro* e o modelo *in vivo* possam compartilhar várias características básicas.

A relação positiva entre TRNSc e frequência de estimulação observada no método da EAC, poderia a princípio ser devida a três mecanismos: (a) ocorrência de bloqueio sinoatrial de primeiro grau, à medida que a frequência de estimulação aumenta (Lu et al., 1965; Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972); (b) variações no balanço celular do íon potássio (Lu et al., 1965; Vassalle, 1965; Narula et al., 1972; Kunze, 1977; Pliam et al., 1977; Vassalle, 1977); e (c) liberação de neurotransmissores autonômicos (acetilcolina - ACh e noradrenalina - NA) devido a estimulação elétrica (Amory & West, 1962; Alanis & Benitez, 1967; Lange, 1965; Lu et al., 1965; Narula et al., 1972; Jalife et al., 1983; Neely et al., 1987).

O mecanismo responsável pela relação positiva entre TRNSc e frequência de estimulação ainda não está completamente estabelecido. Acredita-se, entretanto, que a estimulação elétrica forçada provocaria a excitação das células do NS e das terminações nervosas, induzindo a liberação de neurotransmissores. O efeito inibitório da ACh poderia potencializar a supressão da automaticidade do NS (Lange, 1965; Lu et al., 1965). Na literatura, no estudo da influência da liberação de neurotransmissores sobre o TRNS (Amory & West, 1962; Lu et al., 1965; Chadda et al., 1975; Jalife et al., 1983; Saito et al., 1986), tem sido utilizada estimulação de campo, com alta

corrente e alta frequência ou estimulação direta do NS. No presente trabalho a estimulação foi realizada através de eletrodos de contato (vide item 2.4.1, pag. 26), com baixa corrente e baixa frequência, e, provavelmente, foi insuficiente para provocar uma liberação maciça de neurotransmissores. Esta possibilidade foi verificada, efetuando-se o bloqueio dos receptores colinérgicos e beta-adrenérgicos com atropina e propranolol, respectivamente. Em experimentos realizados nestas condições, a relação TRNSc-frequência de estimulação não foi abolida (vide Figura 3.3, pag. 60). Este fato sugere que outros mecanismos como a ativação da bomba sódio-potássio (ATPase $\text{Na}^+ - \text{K}^+$) ou variações na condutância do íon potássio através da membrana (Lu et al., 1965; Pliam et al., 1977; Vassalle, 1977), produzidas por estimulação elétrica, possam ser fatores adicionais determinando as variações do TRNS com a frequência de estimulação (Kerin et al., 1983; Marques et al., 1988).

O acúmulo extracelular do íon potássio tem sido apontado (Pliam et al., 1977; Vassalle, 1977; Kerin et al., 1983) como um dos fatores responsáveis pela relação positiva entre TRNS e frequência de estimulação, observada in vivo (Mandel et al., 1971; Chadda et al., 1975; Reiffel et al., 1983; Neely et al., 1987) e in vitro (Lu et al., 1965). Neste trabalho, quando a concentração extracelular de KCl ($[\text{KCl}]_o$) foi aumentada, dois efeitos principais foram observados: (a) aumento dos valores de TRNSc determinados a partir de ambos os métodos (EAC e EAP)

(Tabela 3.4); e (b) aparecimento, no método da EAP, de uma relação positiva entre intervalo de estimulação e TRNSc, o que não foi observado na condição controle e em baixa $[KCl]_O$ (vide Figura 3.4).

Quando o tecido cardíaco é estimulado, as células miocárdicas acumulam Na^+ e perdem K^+ em função do número de potenciais de ação na unidade de tempo (isto é, um aumento na frequência de estimulação potencializa este efeito). Um aumento da concentração intracelular de Na^+ e/ou extracelular de K^+ ativa a bomba Na^+-K^+ causando uma hiperpolarização e, em consequência, uma diminuição transitória da automaticidade do NS (Vassalle, 1977), o que causaria um aumento do TRNS com a frequência (vide Figura 3.4A). O aumento da $[KCl]_O$ parece ter potencializado este efeito (Marques & Bassani, 1989a). Este resultado confirma os resultados obtidos por outros autores (Alanis & Benitez, 1967; Pliam et al., 1977), que demonstraram um aumento da pausa após estimulação na presença de altos valores de $[KCl]_O$.

Os valores de TRNSc determinados em baixa $[KCl]_O$ (vide Figura 3.4B) não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos na condição controle. Uma explicação possível pode estar ligada ao fato de que a redução na $[KCl]_O$, em relação ao controle, foi muito pequena para induzir uma inativação parcial da bomba Na^+-K^+ que é observada em condições onde a $[KCl]_O$ é nula (Kunze, 1977). Esta possibilidade foi confirmada em experimentos adicionais, nos quais foi observada a tendência do TRNSc em

tornar-se independente do intervalo de estimulação à medida que a $[KCl]_0$ foi diminuída (vide Figura 3.5).

A atividade do sistema nervoso autonômico também tem sido considerada como um fator que pode influenciar de maneira marcante a determinação do TRNS (Lu et al., 1965; Mandel et al., 1971; Narula et al., 1972; Strauss et al., 1976; Kerin et al., 1983; Cain, 1987; Neely et al., 1987). Neste trabalho, foi avaliado o efeito dos neurotransmissores autonômicos ACh e NA sobre o IEM, TRNS e TRNSc, determinados a partir do método da EAC, em doses que provocaram variações significativas no IEM (Tabela 3.6). A NA diminuiu o IEM e o TRNS, mas não afetou o TRNSc (vide Figura 3.6). Embora tenha sido mostrado que a estimulação simpática não afeta significativamente o TRNS determinado in vivo, em cães anestesiados (Kerin et al., 1983), Pliam et al. (1977) mostraram que a NA reduz a pausa após estimulação em experimentos realizados in vitro em ventrículos de cão, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Por outro lado, tem sido mostrado que a ACh exerce uma grande influência sobre o TRNS in vivo (Kerin et al., 1983) devido, principalmente, ao aumento provocado no IEM (diminuição da frequência espontânea) que apresenta-se como um fator determinante da magnitude do TRNS (Chadda et al., 1975; Pliam et al., 1977; Reiffel et al., 1982; Kerin et al., 1983; Neely et al., 1987). Este fenômeno foi também observado in vitro, neste trabalho, para o efeito da ACh, que aumentou o TRNS e IEM, mas não afetou significativamente o TRNSc. Adicionalmente, observou-

se a existência de uma relação positiva entre TRNSc e IEM determinados sob ação da ACh, o que não aconteceu durante o tratamento da preparação com NA (vide Figuras 3.6 e 3.7). Em vista disso, acredita-se que as alterações produzidas pela ACh e pela NA sobre TRNS tenham sido determinadas pela ação destes neurotransmissores sobre o IEM, enquanto que, a tendência de aumento do TRNSc pela ACh, parece ter sido devida ao efeito depressor e dose-dependente da ACh sobre a velocidade de condução atrial (Marques et al., 1989 a, b).

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância da padronização dos protocolos de estimulação para determinação do TRNS, pois a falta desta padronização tem dificultado o estabelecimento de limites de normalidade para o TRNS e TRNSc, bem como, a avaliação da sensibilidade do método empregado para sua medição (Tonkin & Heddle, 1984; Benditt et al., 1987).

O método da EAP tem sido utilizado para determinação do tempo de condução sinoatrial. Parece plausível, a partir dos dados obtidos no presente trabalho, que sua utilização seja mais explorada para a determinação do TRNS. Para isto, a instrumentação desenvolvida no presente trabalho pode ser usada de imediato em experimentos com animais vivos e com pequenas modificações poderá ser empregada para uso em pacientes.

Seria importante também, levar em consideração situações nas quais o TRNS é determinado na presença de

desequilíbrios iônicos. No presente trabalho, o aumento da concentração extracelular de potássio fez com que os valores de TRNS e TRNSc, determinados a partir dos métodos da EAC e EAP, aumentassem. Embora na prática clínica a determinação do TRNS seja feita com o paciente em condições estáveis, nas quais o equilíbrio ácido básico e hidro-salino estejam sob controle, deve-se lembrar que a condição de isquemia miocárdica leva ao acúmulo extracelular local de potássio (Webb & Poole-Wilson, 1986). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que este fato seja considerado na determinação do TRNS.

Finalmente, sabe-se que nas condições em que o tônus autonômico se apresenta alterado, o valor de TRNS depende diretamente das variações produzidas no IEM (Marques et al., 1989a). Ressalta-se, neste caso, que a medição concomitante de TRNS e TRNSc cujo valor não se altera com modificações do IEM, possibilitaria melhor avaliação da função do NS.

5. CONCLUSÕES

A metodologia e instrumentação desenvolvidas neste trabalho podem ser utilizadas para determinação do tempo de recuperação do nóculo sinusal (TRNS) in vitro, possibilitando o estudo extensivo deste parâmetro, apresentando dados reproduzíveis e de baixa variabilidade.

Dos resultados obtidos da aplicação desta metodologia conclui-se que:

- a) Para frequências de estimulação até 53% acima da frequência espontânea os valores de TRNSc obtidos pelo método da EAC são equivalentes aos produzidos pelo método da EAP;
- b) O uso de frequências de estimulação muito elevadas (acima de 53% da frequência espontânea) pode levar à superestimulação do TRNSc no tecido cardíaco considerado normal;
- c) O aumento da $[KCl]_o$ provocou elevação dos valores de TRNSc em ambos os métodos e surgimento de uma relação positiva entre TRNSc e intervalo de estimulação no método da EAP, provavelmente, por potencializar o efeito da estimulação elétrica, efeito este que parece ser devido a uma ativação da ATPase $Na^+ - K^+$ causada pela perda de K^+ durante a estimulação;
- d) O efeito dos neurotransmissores autonômicos, ACh e NA, sobre o TRNS deve-se a seus efeitos sobre o IEM. Enquanto que a correlação encontrada entre TRNSc e IEM na presença de ACh, parece estar relacionada ao efeito depressor da ACh sobre a velocidade de condução atrial.

Espera-se que a metodologia e instrumentação desenvolvidas possibilitem a intensificação dos estudos para o desenvolvimento de novos métodos de avaliação da função do NS e o teste de modelos animais para o estudo da disfunção do NS.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, J.A.; HIRSCHFELD, D.S.; KUMKEL, F.W. et al. Graded exercise testing in patients with sinus node dysfunctions. *Am. J. Med.*, 62: 330-338, 1977.
- AGRUS, N.S.; ROSIN, E.Y.; ADOLPH, R.J. et al. Significance of chronic sinus bradycardia in elderly people. *Circulation*, 46: 924-930, 1972.
- ALANIS, J. & BENITEZ, D. The decreased in the automatism of the Purkinje pacemaker fibers provoked by high frequencies of stimulation. *Jap. J. Physiol.*, 208: 770-775, 1967.
- AMORY, D.W. & WEST, T.C. Chronotropic response following direct electrical stimulation of the isolated sinoatrial node: A pharmacological evaluation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 137: 14-23, 1962.
- BASHOUR, T.T. Classification of sinus node dysfunction. *Am. Heart J.*, 110: 1251-1256, 1985.
- BENDITT, D.G.; GORNICK, C.C.; DUNBAR, D.; ALMQUIST, A. & SHANDA POOL-SCHNEIDER, R.N. Indications for electrophysiologic testing in the diagnosis and assessment of sinus node dysfunction. *Circulation*, 75(suppl III): 93-99, 1987.
- BONKE, F.I.M.; BOUMAN, L.N. & VAN RIJN, H.E. Change of cardiac rhythm in the rabbit after an atrial premature beat. *Circ. Res.*, 24: 533-544, 1969.
- BONKE, F.I.M.; BOUMAN, L.N. & SCHOPMAN, F.J.G. Effect of an early atrial premature beat on activity of the sinoatrial node and atrial rhythm in the rabbit. *Circ. Res.*, 29: 704-715, 1971.
- BREITHARDT, G.; SEIPEL, L. & LOOGEN, F. Sinus node recovery time and calculated sinoatrial conduction time in normal subjects and patients with sinus node dysfunction. *Circulation*, 56(1): 43-50, 1977.
- BROWN, H.F. Electrophysiology of the sinoatrial node. *Physiol. Rev.*, 62(2): 505-530, 1982.
- CAIN, M.E. Electrophysiologic assessment of sinus node function. *Circulation*, 75(suppl III): 100-102, 1987.
- CHADDA, K.D.; BANKA, V.S.; BODENHEIMER, M.M. & HELFANT, R. Corrected sinus node recovery time. Experimental physiologic and pathologic determinants. *Circulation*, 51: 797-801, 1975.

CHUNG, E.K. *Doenças Cardiovasculares*, 1ed., Rio de Janeiro. Interamericana, 1978. p.398.

DETWEILER, D.K. *Circulação*, in BEST & TAYLOR'S, *As bases fisiológicas da prática médica*, 9ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1976. p. 261-449.

DHINGRA, R.C.; WYNDHAM, C.; AMAT-Y-LEON, F.; DENES, P.; WU, D. & ROSEN, K.M. Sinus nodal response to atrial extrastimuli in patients without apparent sinus node disease. *Am. J. Cardiol.*, 36: 445-452, 1975.

FERRER, M.I. The etiology and natural history of sinus node disorders. *Arch. Intern. Med.*, 142: 371-372, 1982.

FISHER, J.D. Role of electrophysiologic testing in the diagnosis and treatment of patients with known and suspected bradycardias and tachycardias. *Progress in Cardiovascular Disease*, 24(1): 25-90, 1981.

GANONG, W.F. *Review of Medical Physiology*, 14ed., California. Lange Medical Publications, 1969. p. 429-446.

GIZZI, J.C.; BUCHLER, J.R. & SOUSA, J.E.M.R. Eletrograma do feixe de His, II - Doença do nó sinusal, bloqueios A-V e defeitos da condução intraventricular. *Arq. Bras. Cardiol.*, 37(3): 199-212, 1981.

GOLDBERG, A.N.; MORAN, J.F. & RESNEKOV, L. Multi-stage electrocardiographic exercise tests. *Am. J. Cardiol.*, 26: 84-92, 1970.

GOMES, J.A.C.; KANG, P.S. & EL-SHERIF, N. The sinus node electrogram in patients with and without sick sinus syndrome: techniques and correlation between directly measured and indirectly estimated sinoatrial conduction time. *Circulation*, 66: 864-873, 1982.

GORLIN, R.; KNOWLES, J.H. & STOREY, C.F. The Valsalva maneuver as a test of cardiac function. *Am. J. Med.*, 22: 197-212, 1957.

HARIMAN, K.F.; KRONGRAD, E.; BOXER, R.A. et al. Method for recording electrical activity of the sinoatrial node and atrial foci during cardiac catheterization in human subjects. *Am. J. Cardiol.*, 45: 775-781, 1980.

HAWKINS, D.F. Studies on veratrum alkaloids. XXIV. Actions of veratramine on spontaneously beating guinea-pig atrium preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 137: 306-312, 1962.

- HOLDEN, W.; McANULTY, J.H. & RAHIMTOOLA, S.H. Characterization of heart response to exercise in sick sinus syndrome. *Br. Heart J.*, 40: 923-930, 1978.
- IRISAWA, H. Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. *Physiol. Rev.*, 58(2): 461-498, 1978.
- JALIFE, J.; SLENTER, V.A.J.; SALATA, J.J. & MICHAELS, D.C. Dynamic vagal control of pacemaker activity in the mammalian sinoatrial node. *Circ. Res.*, 52(6): 642-656, 1983.
- JAMES, T.N. & NADEAU, R.A. Sinus bradycardia during injections directly into sinus node artery. *Am. J. Physiol.*, 204: 9-15, 1963.
- JAMES, T.N.; SHERF, L.; FINE, G. & MORALES, A.R. Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. *Circulation*, 34: 139-163, 1966.
- JAMES, T.N. The sinus node. *Am. J. Cardiol.*, 40: 965-986, 1977.
- JAMES, T.N. Anatomia de sistema de condução cardíaca, in HURST, J.W., *O coração artérias e veias*, 4ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1981. p. 49-59.
- JAMES, T.N. & SHERF, L. Ultra-estrutura do miocárdio, in HURST, J.W., *O coração artérias e veias*, 4ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1981. p. 59-73.
- JOSÉ, A.D. Effect of combined sympathetic and parasympathetic blockade on heart rate and cardiac function in man. *Am. J. Cardiol.*, 18: 476-478, 1966.
- JORDAN, J.L.; YAMAGUCHI, I. & MANDEL, W.J. Studies on the mechanism of sinus node dysfunction in the sick sinus syndrome. *Circulation*, 57: 217-223, 1978.
- KANG, P.S.; GOMES, J.A.C. & EL-SHERIF, N. Differential effects of functional autonomic blockade of the variables of sinus node automaticity in sick sinus syndrome. *Am. J. Cardiol.*, 49: 273-282, 1982.
- KAPLAN, B.M.; LANGENDORF, R.; LEV, M. & PICK, A. Tachycardia-bradycardia syndrome (so-called "sick sinus syndrome"). Pathology, mechanisms and treatment. *Am. J. Cardiol.*, 31: 497-508, 1973.
- KARAGUEUZIAN, H.S.; JORDAN, J.L.; SUGI, K.; OHTA, M.; GANG, E.; PETER, T. & MANDEL, W.J. Appropriate diagnostic studies for sinus node dysfunction. *Pacing And Clinical Electrophysiology*, 8: 242-254, 1985.

- KEPPEL, G. Design and Analysis: A Researcher's Handbook. Englewood: Prentice-hall, 1982. p. 513.
- KERIN, N.Z.; LOURIDAS, G.; EDELSTEIN, J. & LEVY, M.N. Interactions among the critical factors affecting sinus node function: The quantitative effects of the duration and frequency of atrial pacing and of vagal and sympathetic stimulation upon overdrive suppression of the sinus node. *Am. Heart J.*, 105: 215-222, 1983.
- KLEIN, H.O.; SINGER, D.H. & HOFFMAN, B.F. Effects of atrial premature systoles on sinus rhythm in the rabbit. *Circ. Res.*, 32: 480-491, 1973.
- KRISHNASWAMI, V. & GERACI, A.R. Permanent pacing in disorders of sinus node function. *Am. Heart J.*, 89(5): 579-585, 1975.
- KUNZE, D.L. Rate-dependent changes in extracellular potassium in the rabbit atrium. *Circ. Res.*, 41(1): 122-127, 1977.
- LANGE, G. Action of driving stimuli from intrinsic and extrinsic sources on in situ cardiac pacemaker tissues. *Circ. Res.*, 17: 449-459, 1965.
- LU, H.H.; LANGE, G. & BROOKS, C.McC. Factors controlling pacemaker action in cells of sino-atrial node. *Circ. Res.*, 17: 460-471, 1965.
- LUCCHESI, B.R. Antiarrhythmic drugs: key references. *Circulation*, 59: 1076-1078, 1979.
- MACIEL, B.C.; GALLO, L.; MARIN NETO, J.A.; LIMA FILHO, E.C. & MARTINS, L.E.B. Autonomic nervous control of the heart rate during dynamic exercise in normal man. *Clinical Science*, 71: 457-460, 1986.
- MANDEL, W.J.; HAYAKAWA, H.; DANZIG, R. & MARCUS, H.S. Evaluation of sino-atrial node function in man by overdrive suppression. *Circulation*, 44: 59-66, 1971.
- MANDEL, W.J.; HAYAKAWA, H.; ALLEN, H.N. et al. Assessment of sinus node function in patients with the sick sinus syndrome. *Circulation*, 46: 761-769, 1972.
- MANDEL, W.J.; LAKE, M.M. & OBAYASHI, K. Sinus node function: Evaluation in patients with and without sinus node disease. *Arch. Intern. Med.*, 135: 388-394, 1975.

- MARQUES, J.L.B.; RUIZ, E.V.; BASSANI, R.A. & BASSANI, J.W.M. Influence of stimulatory parameters on sinus node recovery time: an in vitro study. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 21: 1079-1082, 1988.
- MARQUES, J.L.B. & BASSANI, J.W.M. Influence of the KCl concentration on rat sinus node recovery time in vitro. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 22: 803-806, 1989a.
- MARQUES, J.L.B.; BASSANI, R.A. & BASSANI, J.W.M. Tempo de recuperação do nódulo sinusal in vitro: Efeitos da Noradrenalina (NA) e da Acetilcolina (ACh). *Anais da IV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. Caxambú, MG, 29 Junho - 2 Julho, 1989a.*
- MARQUES, J.L.B. & BASSANI, J.W.M. Instrumentation for in vitro sinus node recovery time determination. V Mediterranean Conference on Medical & Biological Engineering, MEDICON 89 (annals). University of Patras, Greece, Aug. 29 - Sept. 1, 1989b.
- MARQUES, J.L.B.; BASSANI, R.A. & BASSANI, J.W.M. Methodology and instrumentation for in vitro sinus node recovery time determination. *J. Pharmacol. Methods* (in press), 1989b.
- MARRIOTT, H.J.L. & MEYRBURG, R.J. Reconhecimento e tratamento das arritmias cardíacas e distúrbios na condução, in HURST, J.W., *O coração artérias e veias*, 4ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1981. p. 662.
- MICHELSON, E.L. & DREIFUS, L.S. Present status of clinical electrophysiologic studies: Introduction - What studies are necessary? *Pacing And Clinical Electrophysiology*, 7: 421-431, 1984.
- MILLER, H.C. & STRAUSS, H.C. Measurement of sinoatrial conduction time by premature atrial stimulation in the rabbit. *Circ. Res.*, 35: 935-947, 1974.
- MILNOR, W.R. Properties of cardiac tissues, in MOUNTCASTLE, V.B., *Medical Physiology*, 14ed., London. The C.V. Mosby, 1980. p. 961-985.
- MOND, H. The Bradyarrhythmias: Current Indications for Permanent Pacing (Part II). *Pacing And Clinical Electrophysiology*, 4: 538-547, 1981.
- NARULA, D.S.; SAMET, P. & JAVIER, R.P. Significance of the sinus-node recovery time. *Circulation*, 45: 140-158, 1972.

- NARULA, O.S.; SHANTHA, N.; VASQUEZ, M.; TOWNE, W.D. & LINHART, J.W. A new method for measurement of sinoatrial conduction time. *Circulation*, 58(4): 706-714, 1978.
- NEELY, B.H.; URTHALER, F. & SMITH, L.R. The effects of negative chronotropic interventions on sinus node recovery time. *Basic Res. Cardiol.*, 82(1): 92-100, 1987.
- PACHÓN, J.C.; KORMANN, D.S.; PACHÓN, M.Z.C.; PACHÓN, E.I.; ALBORNOZ, R.N.; GALVÃO FILHO, S.; GIZZI, J.C. & SOUZA, J.E.M.R. Cardioestimulação Transesofágica - Método Atraumático Simplificado. *ARS CURANDI*, Abril: 56-86, 1986.
- PLIAM, M.B.; KRELLSTEIN, D.J.; BROOKS, C.McC. & VASSALLE, M. Norepinephrine, potassium and overdrive suppression. *Basic Res. Cardiol.*, 72: 34-45, 1977.
- REIFFEL, J.A.; BIGGER, J.T.JR. & KONSTAM, M.A. The relationship between sinoatrial conduction time and sinus cycle length during spontaneous sinus arrhythmia in adults. *Circulation*, 50: 924-934, 1974.
- REIFFEL, J.A.; GANG, E.; GLIKLICH, H. et al. The human sinus node electrogram: A transvenous catheter technique and a comparison of directly and indirectly estimated sinoatrial conduction time in adults. *Circulation*, 62: 1324-1334, 1980.
- REIFFEL, J.A.; GANG, E.; BIGGER, J.T.JR.; LIVELLI, F.; ROLNITZKY, L. & CRAMER, M. Sinus node recovery time related to paced cycle length in normals and patients with sinoatrial dysfunction. *Am. Heart J.*, 104(4): 746-752, 1982.
- ROSEN, M.R.; WIT, A.L. & HOFFMAN, B.F. Electrophysiology and pharmacology of cardiac arrhythmias. *Am. Heart J.*, 88: 1974.
- ROSEN, M.R. Is the response to programmed electrical stimulation diagnostic of mechanisms for arrhythmias?. *Circulation*, 73(suppl II): 18-27, 1986.
- SAITO, A.; ISHIKAWA, T.; MASAKI, T.; KIMURA, S. & GOTO, K. Pharmacological analysis of autonomic innervation of the right atria rats and guinea-pigs: Demonstration of nonadrenergic noncholinergic nerves. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 238(2): 713-719, 1986.
- SCARPA, W.J. The sick sinus syndrome. *Am. Heart J.*, 92(5): 648-660, 1976.

- SCHWEITZER, P. & MARK, H. The values and limitations of deductive analysis and electrophysiological testing in patients with sinoatrial arrhythmias. *Pacing And Clinical Electrophysiology*, 7: 403-420, 1984.
- SINGH, B.N.; COLLETT, J.T. & CHEW, C.Y.C. New perspectives in the pharmacologic therapy of cardiac arrhythmias. *Progress in Cardiovascular Disease*, 22: 243-301, 1980.
- STRAUSS, H.C. & BIGGER, J.T.JR. Slowed conduction, block and reentry in perinodal fibers (abstr.). *Circulation*, 44(suppl. II): II-74, 1971.
- STRAUSS, H.C. & BIGGER, J.T.JR. Electrophysiological properties of the rabbit sino-atrial perinodal fibers. *Circ. Res.*, 31: 490-506, 1972.
- STRAUSS, H.C.; SAROFF, A.L.; BIGGER, J.T.JR. & GIARDINA, E.G.V. Premature atrial stimulation as a key to the understanding of sinoatrial conduction in man. Presentation of data and critical review of literature. *Circulation*, 47: 86-93, 1973.
- STRAUSS, H.C.; BIGGER, J.T.JR.; SAROFF, A.L. & GIARDINA, E.G.V. Electrophysiologic evaluation of sinus node function in patients with sinus node dysfunction. *Circulation*, 53(5): 763-776, 1976.
- THERY, C.; GOSSELIN, B.; LEKIEFFRE, J. & WAREMBOURG, H. Pathology of sinoatrial node. Correlations with electrocardiographic findings in 111 patients. *Am. Heart J.*, 93(6): 735-740, 1977.
- THORMAN, J.; SCHWARZ, F.; ENSSLEN, R. et al. Vagal tone, significance of electrophysiologic findings and clinical course in symptomatic sinus node dysfunction. *Am. Heart J.*, 95: 725-731, 1978.
- TONKIN, A.M. & HEDDLE, W.F. Electrophysiological testing of sinus node function. *Pacing And Clinical Electrophysiology*, 7: 735-748, 1984.
- VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H. & LUCIANO, D.S. *Fisiologia Humana*, 3ed., São Paulo. McGraw-Hill, 1980. p. 291-377.
- VASSALLE, M. Cardiac pacemaker potentials at different extra- and intracellular K concentrations. *Am. J. Physiol.*, 17: 556-571, 1965.
- VASSALLE, M. The relationship among cardiac pacemakers. Overdrive suppression. *Circ. Res.*, 41(3): 269-277, 1977.

- YEE, R. & STRAUSS, H.C. Electrophysiologic mechanisms: sinus node dysfunction. *Circulation*, 75(suppl III): 12-18, 1987.
- WEBB, S.C. & POOLE-WILSON, P.A. Potassium exchange in the human heart during atrial pacing and myocardial ischaemia. *Br. Heart J.*, 55: 554-559, 1986.

7. APÊNDICE

Unidade Isolada de Captação/Estimulação (UICE)

O diagrama em blocos desta unidade é apresentado na Figura 2.8. A secção A (captação/deteccção, Figura I-A) é constituída por um pré-amplificador de entrada, acoplador óptico, filtro passa-faixa passivo, amplificador de saída, filtro notch-60 Hz e detector de picos, todos implementados com componentes eletrônicos existentes no mercado nacional.

O pré-amplificador de entrada é formado por dois estágios: um primeiro estágio com entrada diferencial (amplificador de instrumentação) baseado no LM 725, CMRR=120 dB, ganho 20 x, e um segundo estágio (LM 308, ganho= 10 x) que permite o ajuste da tensão de "offset" ("trimpot" 1) e determina o ganho total do pré-amplificador (200 x). A chave CH1 na posição 2 (entradas A, B, C e D) permite a captação das derivações precordiais do eletrocardiograma; e na posição 1 (entradas A e C), a captação de sinais bipolares.

A função do acoplador óptico (4N25) é transmitir o sinal captado pelo pré-amplificador ao estágio seguinte, sem que haja uma ligação elétrica entre eles. Assim, a parte do circuito de captação/deteccção (pré-amplificador) que entra em contato com a preparação biológica estará isolada eletricamente do circuito da rede e dos demais equipamentos utilizados em conjunto (e.g. osciloscópio).

FIGURA I -A

A banda passante do sistema, 5 Hz a 150 Hz, é determinada pela utilização de dois filtros passivos (passa-altas e passa-baixas) em cascata.

O circuito do amplificador de saída é formado por dois estágios: um primeiro estágio (LM 358) com ganho fixo (5 x), e um segundo estágio (LM 358) para ajuste do ganho total 1500, 3000, 8000 ou 16000 x através da chave CH3. Uma chave (CH2) ligada à entrada (+) do amplificador de saída, permite acoplar a entrada deste estágio ao sinal captado pelo pré-amplificador ou ao sinal obtido na saída auxiliar (~ 1 V) de um monitor cardíaco.

O filtro notch-60 Hz é utilizado para minimizar interferências da rede elétrica. A frequência de corte (60 Hz) é ajustada pelos "trimpots" 2 e 3.

O circuito comparador/detector é constituído pelo amp. op. LM 308, transistores PNP 2907 e NPN BC 548, e um duplo monoestável CD 4098. O nível de comparação pode ser ajustado através do potenciômetro P1 entre ± 3 V. O primeiro monoestável fornece um pulso de 75 ms de duração que aciona um "LED" no painel de controle. A saída do primeiro monestável atua como "trigger" para o segundo, o qual fornece um pulso de 20 μ s (nível TTL) utilizado pelo microcomputador dedicado como sinal de sincronismo, correspondente a cada atividade elétrica atrial detectada.

A secção B (estimulação, Figura I-B) é constituída

por um acoplador óptico, gerador interno de pulsos e gerador de corrente.

O acoplador óptico (4N25) tem como objetivo, isolar eletricamente o estimulador (alimentado a bateria ± 15 V) do microcomputador dedicado ou de outro dispositivo utilizado para disparo e controle do estimulador elétrico.

O gerador interno de pulsos produz pulsos retangulares, monopolares ou bipolares, positivos ou negativos de largura variável (50 μ s a 150 ms). Estes pulsos são obtidos na saída do CI-6 que pode assumir três valores distintos de acordo com a condição das chaves analógicas do CI-5. Normalmente, as chaves estão ativas e os resistores R_a e R_b estão aterrados. Se uma das chaves for desativada, então o circuito passa a ter uma configuração clássica de amplificador. Dependendo de qual chave é desativada o ganho do amplificador será $+G$ ou $-G$. O ganho G é igual nas duas situações e nos dois casos o amplificador é ligado a uma fonte de tensão constante (diodo zener = 6,8 V). Tem-se, portanto, na saída do CI-6 duas tensões $+V_o$ e $-V_o$. O controle das chaves analógicas é feito pelos CI's 2, 3 e 4. Sempre que houver um pulso positivo na entrada ck do CI-2A haverá um pulso positivo na entrada $+T$ do CI-4. O CI-4 é um gerador monoestável cuja duração do pulso é determinada pela constante RC, que é alterada pela chave CH2 e pelo potenciômetro P2. Ao detectar este pulso, o CI-4 é acionado mantendo uma das chaves analógicas desativadas por meio das portas do CI-3 (CI-3B e CI-3C). A chave a ser

desativada neste instante é selecionada por meio de CH3. O flip-flop de entrada CI-2A é mantido "resetado" durante o tempo em que o CI-4 é acionado, garantindo que a entrada +T fique no nível lógico "0". Assim o circuito somente poderá ser acionado novamente após finalizado um ciclo de operação. Ao término do período ativo do monoestável ocorrerá um pulso positivo na entrada ck do flip-flop (CI-2B), se a chave CH3 estiver em uma das posições em que o CI-2B é mantido em "reset" permanente, então, nada ocorre e o circuito volta a sua condição inicial. Caso contrário haverá um novo pulso de disparo na entrada +T do CI-4, desta vez provocado pela mudança de estado do CI-2B. O CI-4 permanece ativo por um novo período igual ao anterior, mas desativando agora a chave que estava ativa da primeira vez. Assim obtem-se um pulso bipolar com a duração da fase positiva idêntica a da fase negativa. Ao final do segundo período ativo do CI-4 o circuito completa um ciclo e retorna à condição inicial de operação.

Os pulsos de disparo aplicados ao CI-2A são provenientes de duas fontes selecionáveis pela chave CH1 e CI-1A. Uma fonte é o CI-1B que é um gerador estável (0,5 a 20 Hz) de frequência controlável por meio do potenciômetro P1. A outra é uma entrada para disparo externo.

O gerador de corrente, é uma fonte de corrente de intensidade variável (0 a 5,5 mA). O circuito é composto por um amplificador de entrada (CI-7) e uma fonte de corrente (CI-8). O

amplificador de entrada controla a amplitude do pulso de tensão a ser aplicado à fonte de corrente, através do potenciômetro P3. A corrente que flui pela carga (preparação biológica) depende da amplitude do sinal de tensão que chega à fonte de corrente através do resistor R_c e do valor do resistor R_d . A saída do gerador de corrente pode ser alternativamente ligada a um resistor (1 Kohm) através da chave CH4, para que a amplitude e duração dos estímulos possam ser ajustados. No osciloscópio se obterá um pulso de tensão proporcional ao estímulo de corrente gerado.

Microcomputador Dedicado (MD)

O microcomputador dedicado (MD) tem como processador central o microprocesador Intel 8085A. Seu funcionamento é conhecido e detalhes poderão ser encontrados na literatura especializada (Intel, 1980; National, 1980). O microcomputador montado (Figura II-A e B) pode ser dividido nas seguintes partes: bloco CPU, bloco de memória, bloco de interface (endereçamento, sinalização e "display").

O bloco CPU (Figura II-A) contém o microprocessador (8085A), dois "buffers/latches" (8212) para o barramento de endereços, um "buffer" bidirecional paralelo (74245) para o barramento de dados/endereços. O relógio é providenciado por um cristal de 6,144 MHz. O bloco de memória contém um decodificador de endereços (74138), 2K bytes de memória EPROM ("Erasable

Programmable Read Only Memory" - 2716) para os programas residentes, 2K bytes de memória RAM ("Random Access Memory" - 6116) utilizada como memória de dados e área de trabalho. O bloco de interface contém um decodificador de endereços (74138), uma interface periférica paralela (8255). Para conexão da interface paralela com os circuitos de entrada/saída (contadores, "display", impressora), foi utilizado um estágio de isolamento e "driver" (74244). Todos os blocos serão descritos a seguir:

A Unidade Central de Processamento (CPU) possui 16 linhas constituindo o barramento de endereços, 8 linhas de dados e vários sinais de controle. O barramento de dados é compartilhado com o byte (8 bits) menos significativo do barramento de endereços (A0 a A7), durante o primeiro ciclo de máquina. A cada ciclo de máquina que envolva operação com memória ou interface, alterando assim o barramento de endereços, aparece neste barramento o endereço desejado (A0 a A15) e o sinal ALE ("Address Latch Enable"). Este sinal é usado para "gravar" a parte menos significativa deste endereço (A0 a A7) no "buffer latch" (8212) e, após isto ocorrer, as linhas AD0 a AD7 da CPU tornam-se barramento de dados. Estes pinos são ainda ligados a um "buffer" bidirecional (74245). O controle deste "buffer" é feito por dois sinais (DIR e Enable). O pino $\bar{G}$ (enable) é ligado ao "reset out" da CPU, selecionando o dispositivo permanentemente exceto na condição de "reset" da CPU. O pino DIR, ligado ao pino $\bar{RD}$ da CPU, controla o fluxo de dados (da CPU para o sistema, ou deste para CPU). Este controle é feito da seguinte maneira: se DIR= "1", o

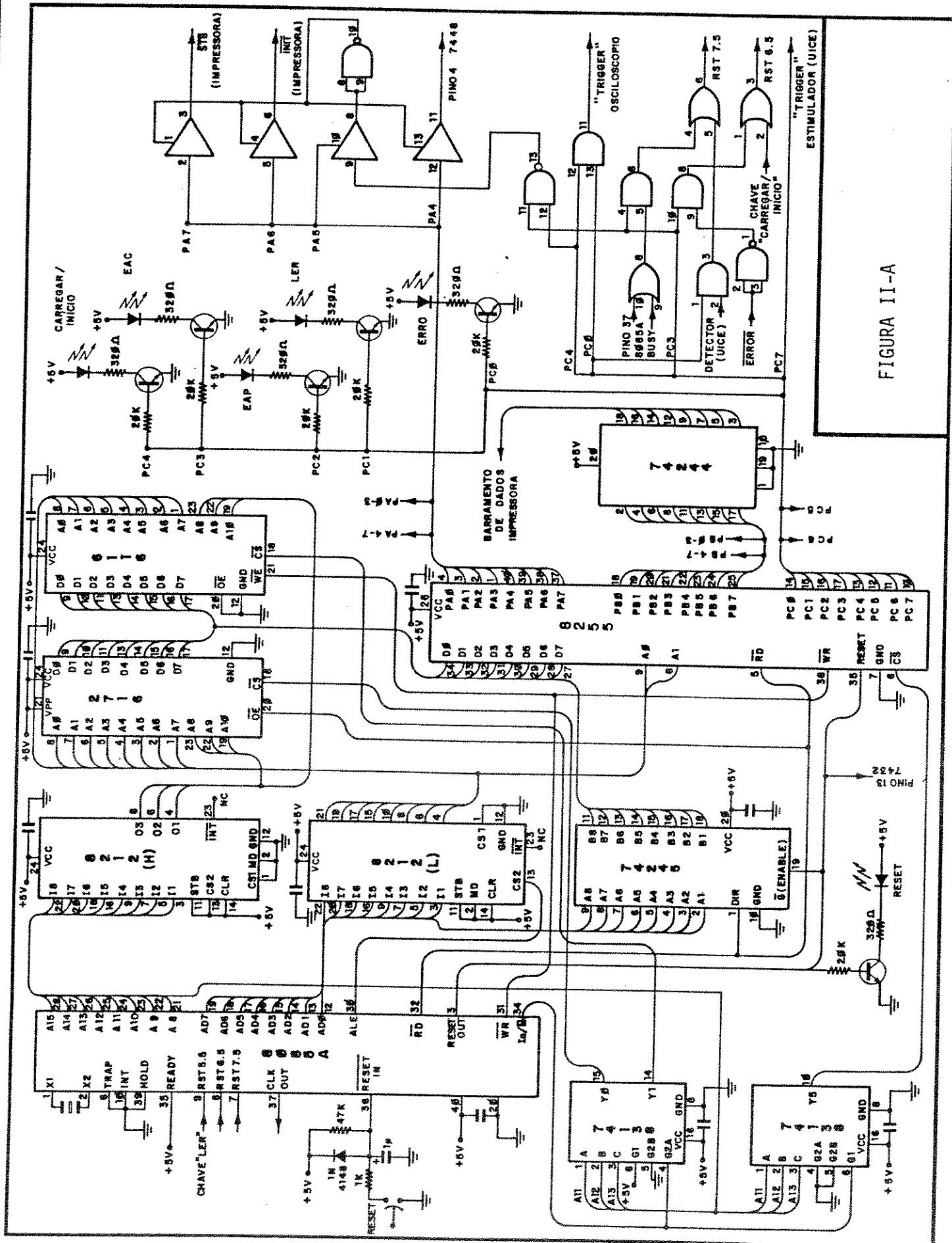


FIGURA II-A

fluxo de dados é da CPU para o sistema; se DIR= "0", o fluxo de dados é do sistema para a CPU.

Há a possibilidade de o usuário reinicializar o sistema sempre que o desejar. Isto é feito por meio de uma chave do tipo "pushbutton" colocada no painel de controle. No pino 36 da CPU (RESET IN) há um nível alto ("1") permanente. A chave de "reset" ao ser pressionada força um nível baixo ("0") neste pino, levando o apontador de programa (PC) para a posição 0000H, reiniciando o sistema.

O acesso à memória é feito pelos barramentos de dados e endereços (D0 a D7 e A0 a A10, respectivamente). É utilizado um decodificador de endereços (74138) com três entradas (A, B e C) para selecionamento, três entradas (G1, G2A e G2B) para controle ou habilitação, e duas saídas que são sinais de controle (ativos em nível baixo) que, quando ligados ao $\overline{CS}$ ("chip select") de cada bloco de 2k byte de memória, selecionam o bloco a ser acessado. A entrada A é ligada à linha de endereço A11, B à linha A12 e C à linha A13. A entrada G1 é deixada em nível alto, a entrada G2A é ligada ao sinal $Io/\overline{M}$ e a entrada G2B é deixada em nível baixo. Quando $Io/\overline{M}$ = "1", não há selecionamento de memória; se $Io/\overline{M}$ = "0", um bloco de memória será selecionado pela combinação de A11, A12 e A13. As saídas Y0 e Y1 do decodificador são ligadas aos pinos "chip select" ($\overline{CS}$) das memórias EPROM e RAM respectivamente. Os primeiros 2k bytes (0000H a 07FFH) são endereços de programas residentes em EPROM. No segundo bloco, os

endereços 0800H a 0BFFH, definem uma região da memória utilizada como área de trabalho. Além disso, o pino 20 da memória EPROM (2716) é ligado ao sinal $\overline{RD}$ (leitura) que, quando em nível baixo, permite a leitura do conteúdo da posição de memória selecionada. O pino 21 da memória RAM (6116) é ligado ao sinal $\overline{WR}$ (escrita) que, quando em nível baixo, permite a CPU escrever um dado na posição de memória especificada e, quando em nível alto juntamente com o pino 18 ($\overline{CS}$) em nível baixo, permite a leitura do conteúdo da posição de memória especificada.

O selecionamento da interface de entrada e saída (E/S) é feito por outro decodificador de endereços (74138) com as linhas de endereço A11, A12 e A13 ligadas às entradas A, B e C respectivamente. As entradas G2A e G2B são deixadas em nível baixo, enquanto que a entrada G1 é ligada ao sinal $Io/\overline{M}$ e a saída Y5 do decodificador é ligada ao pino 6 ($\overline{CS}$) da interface. Quando $Io/\overline{M} = "1"$, pode ser selecionada a interface (dependendo da combinação existente nas entradas A, B e C). Se $Io/\overline{M} = "0"$, não há selecionamento da interface, mas sim da memória.

Para comunicação entre o usuário e o microcomputador dedicado é utilizada uma interface periférica programável (8255) que pode receber e transmitir dados na forma paralela (8 bits).

Esta interface possui três portas (A, B e C) de entrada e saída (E/S) de dados, um registrador da palavra de controle (RPC) e aceita os sinais de controle $\overline{RD}$, $\overline{WR}$, $\overline{CS}$ e RESET.

Para a seleção das portas ou do registrador da palavra de controle, liga-se as linhas de dados/endereços A1 e A0 aos pinos 8 e 9 da interface, respectivamente. Este selecionamento é realizado da seguinte maneira:

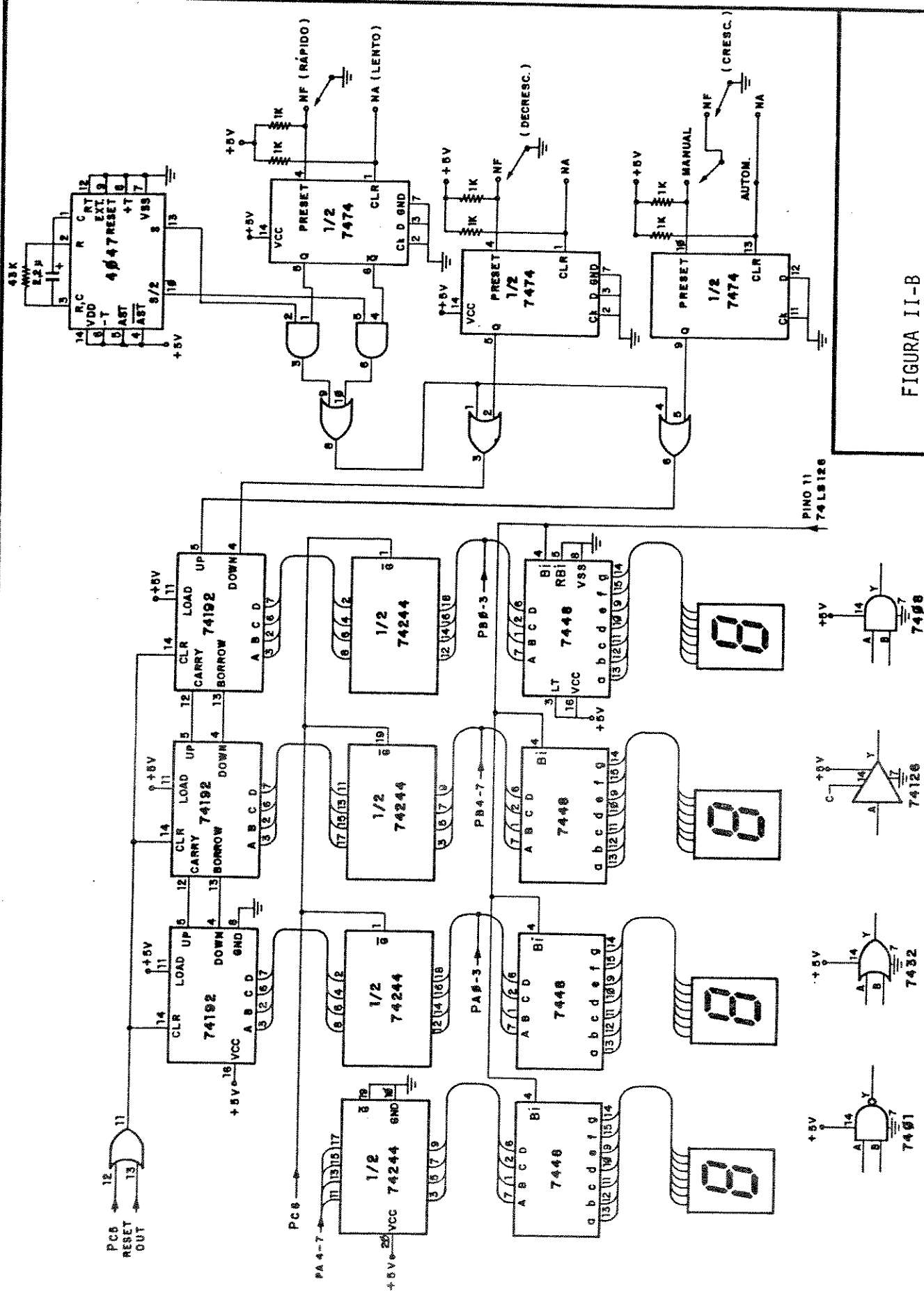
A0	A1	seleciona
0	0	Porta A
0	1	Porta B
1	0	Porta C
1	1	RPC

Verifica-se que para a interface paralela de E/S utilizada estão associados quatro endereços. Os endereços das portas da interface são apresentados a seguir (em hexadecimal):

	endereço
Porta A	28 H
Porta B	29 H
Porta C	2A H
RPC	2B H

A interface de E/S está programada para operar no modo 0, com as portas A, B e C como entrada ou saída de dados, dependendo da palavra de controle (RPC). Os sinais A0 e A1 estão ligados ao "buffer" unidirecional (8212) e o barramento de dados ao "buffer" bidirecional (74245).

O bloco endereçamento/sinalização e "display" (Figura II-B) é constituído por um oscilador estável (CD 4047); portas lógicas ("AND", "OR" e "NAND"); duas chaves "pushbutton" (CRESC. e DECRESC.) que incrementam/decrementam três contadores



BCD ligados em cascata, utilizados para selecionamento (geração dos códigos decimais) das tarefas; três chaves "pushbutton" (RESET, CARREGAR/INÍCIO e LER) usadas para controle do sistema; "buffers tri-state" (74244); quatro decodificadores BCD para sete segmentos (7448) e quatro "displays" de sete segmentos (PD 507).

Os quatro bits menos significativos da porta B da interface (PB0 a PB3) são ligados à saída do primeiro contador e à entrada do primeiro decodificador (unidade); e os bits mais significativos (PB4 a PB7) da porta B, estão ligados à saída do segundo contador e à entrada do segundo decodificador (dezena). O terceiro contador é ligado aos bits menos significativos da porta A (PA0 a PA3) e à entrada do terceiro decodificador (centena). Os contadores são ligados à interface e aos decodificadores (7448) através dos "buffers" 74244. Os bits mais significativos da porta A (PA4 a PA7) são ligados ao quarto decodificador (milhar) através de um "buffer" permanentemente habilitado. Os "buffers tri-state" (74244) isolam as portas (A e B) da interface dos contadores, de modo que quando os "buffers" estiverem desabilitados não existe comunicação entre os contadores e a interface. O controle habilita/desabilita é feito pelo bit PC5 da porta C.

Os bits PC0 a PC4 da porta C são utilizados para controle dos "leds" indicadores, que sinalizam qual operação está sendo executada no momento, enquanto que os bits PC6 e PC7 são utilizados como sinais de sincronismo para o osciloscópio e

disparo ("trigger") para a unidade de estimulação da UICE, respectivamente (ver Figura 2.7).

Com esta configuração o sistema pode "ler" (os códigos das tarefas desejadas) ou apresentar dados (resultados) através do "display" do painel de controle ou impressora.

Para conexão do MD com uma impressora utilizou-se os bits PC0, PC3 e PC4 da porta C e os bits PA4 a PA7 da porta A para controle e comunicação do MD com a impressora. Para transferência de dados foram usados os bits PB0 a PB7 da porta B. Os sinais de controle ($\overline{STB}$ e $\overline{INIT}$) e os dados foram transmitidos à impressora através de "buffers tri-state" (74126 e 74244, respectivamente).

Nas Figuras III e IV são mostrados os relatórios obtidos para os métodos da estimulação atrial contínua (EAC) e estimulação atrial prematura (EAP), respectivamente.

Nome: J.L.B. Marques

E A C

Data: / /

Experimento:

M (ms)	f estim. (est/min)	t estim. (min)	TRNS (ms)	intervalos espontâneos (ms)							
				1	2	3	4	5	6	7	8
0200	0380	0001	0231	0196	0197	0198	0198	0196	0197	0198	0197
0200	0460	0001	0232	0201	0201	0202	0200	0199	0198	0199	0199
0200	0540	0001	0239	0207	0199	0198	0198	0199	0198	0198	0198
0200	0620	0001	0247	0203	0201	0198	0198	0198	0199	0198	0198
0200	0700	0001	0241	0217	0201	0204	0199	0201	0201	0198	0201

Figura III - Relatório obtido para o método da estimulação atrial contínua (EAC). M, média de oito intervalos espontâneos; f estim., frequência de estimulação; t estim., período de estimulação; TRNS, tempo de recuperação do nóculo sinusal e oito intervalos espontâneos após estimulação elétrica.

Nome: J.L.B. Marques

E A P

Data: / /

Experimento:

M (ms)	PREM. (%)	PREM. (ms)	TRNS (ms)	intervalos espontâneos (ms)							
				1	2	3	4	5	6	7	8
0200	0080	0160	0234	0204	0204	0205	0204	0205	0204	0204	0204
0200	0065	0130	0233	0205	0205	0205	0204	0205	0205	0204	0205
0200	0055	0110	0233	0206	0205	0204	0205	0205	0205	0205	0205
0200	0050	0100	0233	0206	0203	0202	0206	0204	0203	0203	0203
0200	0045	0091	0233	0206	0204	0205	0204	0205	0204	0205	0205

Figura IV - Relatório obtido para o método da estimulação atrial prematura (EAP). M, média de oito intervalos espontâneos; PREM.(%), prematuridade do estímulo como porcentagem da média; PREM.(ms), prematuridade do estímulo em milissegundos calculada a partir de M e PREM.(%); TRNS, tempo de recuperação do nóculo sinusal e oito intervalos espontâneos após o estímulo extra.

REFERÊNCIAS TÉCNICAS

- BERLIN, H.M. Design of Active Filters with experiments, 1ed, Indianapolis, Indiana. Blacksburg, 1981.
- INTEL Component Data Catalog. Intel Corporation, 1980.
- LEVENTHAL, L.A. 8080A-8085 Assembly Language Programming, Berkeley, California. OSBORNE/McGraw-Hill, 1978.
- MALVINO, A.P. Eletrônica, vol.I, São Paulo. McGraw-Hill, 1986.
- NATIONAL SEMICONDUCTOR, Linear ICs for consumer applications, 1980.
- NATIONAL SEMICONDUCTOR CORPORATION, Linear Databook, California, 1982.
- OSBORNE, A. An Introduction to microcomputers, Basic concepts, vol.I, 2ed, Berkeley, California. McGraw-Hill, 1980.
- RCA SOLID STATE COS/MOS Integrated Circuits. Printed in USA. RCA Corporation, 1978.
- SERRA, C.P. Teoria e Projeto de Filtros, vol.I e II, 1ed, Campinas-SP. Cartgraf, 1983.
- TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED, The TTL Data Book for design engineers, 2ed, Dallas, Texas. Texas Instruments, 1976.
- TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED, The Optoelectronics Data Book for design engineers, 5ed, Dallas, Texas. Texas Instruments, 1978.
- TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED, The Linear Control Circuits Data Book for design engineers, 2ed, Dallas, Texas. Texas Instruments, 1980.
- VISCONTI, A.C.J.F. Microprocessadores 8080 e 8085. Hardware, vol.I, 6ed, São Paulo. Érica, 1981.
- VISCONTI, A.C.J.F. Microprocessadores 8080 e 8085. Software, vol.II, 6ed, São Paulo. Érica, 1981.