

OLÍVIA CAMPOS COIADO

**EFEITOS DO ULTRASSOM DE POTÊNCIA SOBRE O
CORAÇÃO: EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

***EFFECT OF HIGH POWER ULTRASOUND ON THE
HEART: IN VITRO AND IN VIVO EXPERIMENTS***

CAMPINAS
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA**

OLÍVIA CAMPOS COIADO

**EFEITOS DO ULTRASSOM DE POTÊNCIA SOBRE O
CORÇÃO: EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

***EFFECT OF HIGH POWER ULTRASOUND ON THE HEART:
IN VITRO AND IN VIVO EXPERIMENTS***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Engenharia Elétrica, na área de: Engenharia Biomédica

*Doctorate thesis presented to School of Electrical and
Computer Engineering of the University of Campinas to obtain the
Ph.D grade in Electrical Engineering in area: Biomedical Engineering*

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa
Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Almada Bassani

*Advisor: Ph.D Eduardo Tavares Costa
Co advisor: Ph.D Rosana Almada Bassani*

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA OLÍVIA CAMPOS COIADO,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDUARDO TAVARES COSTA**

**CAMPINAS
2012**

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

C664e Coiado, Olívia Campos
Efeitos do ultrassom de potência sobre o coração:
experimentos in vitro e in vivo / Olívia Campos Coiado.
--Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadores: Eduardo Tavares Costa, Rosana
Almada Bassani.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de
Computação.

1. Ultra-som na medicina. 2. Coração. 3. Efeitos
fisiológicos. 5. Arritmia. I. Costa, Eduardo Tavares,
1956-. II. Bassani, Rosana Almada, 1955-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Effect of high power ultrasound on the heart: in vitro and in vivo
experiments

Palavras-chave em Inglês: Ultrasound in medicine, Heart, Physiological effects,
Arrhythmia

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Doutora em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Wagner Coelho de Albuquerque Pereira, Antônio Adilton
Oliveira Carneiro, Pedro Xavier de Oliveira, Wilson
Nadruz Junior

Data da defesa: 15-08-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

Candidata: Olívia Campos Coiado

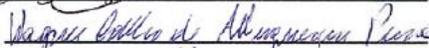
Data da Defesa: 15 de agosto de 2012

Título da Tese: "Efeitos do ultrassom de potência sobre o coração: experimentos in vitro e in vivo"

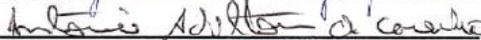
Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa (Presidente):



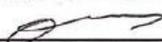
Prof. Dr. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira:



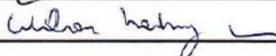
Prof. Dr. Antônio Adilton Oliveira Carneiro:



Prof. Dr. Pedro Xavier de Oliveira:



Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior:



Dedicatória

*Dedico este trabalho
aos meus pais Jane e Evaldo,
meus verdadeiros amores.*

APOIO

Este trabalho teve o apoio imprescindível da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc: 08/54165-2, bolsa de doutorado).

AGRADECIMENTOS

Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica e pesquisadores do Centro de Engenharia Biomédica, em especial aos professores Eduardo Tavares Costa e Rosana Almada Bassani pela orientação, confiança, apoio e competência, imprescindíveis ao desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. William O'Brien Jr., do *Bioacoustics Research Laboratory da University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC)*, pela oportunidade, conhecimento, suporte, por acreditar na minha capacidade e motivar o meu crescimento a cada dia.

Ao Prof. Dr. Wawrzyniec Lawrence Dobrucki e Profa. Dra. Iwona Dobrucka do *Biomedical Imaging Center da University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC)* pelos ensinamentos e conhecimentos da prática cirúrgica.

A todos os colegas da *University of Illinois*, especialmente Rita Miller, Emily Hartman, Sandhya Sarwate, Michael Kurowski, Susan Clay e Mary Mahaffey, por todos os momentos em que me ajudaram.

À minha amiga Elaine Belassiano Buiochi, pela amizade, por abrir as portas para o meu estágio no exterior, por entender e partilhar das mesmas dificuldades encontradas ao longo desse trajeto e sempre me ajudar a encontrar uma solução.

Ao Prof. Dr. Pedro Xavier Oliveira, pela amizade e incentivo constantes.

Aos secretários, engenheiros, técnicos e estagiários do Centro de Engenharia Biomédica, em especial à bióloga Elizângela S. Oliveira e ao tecnólogo Carlos Alberto Lourenço da Silva, pelo apoio técnico e eficiência, e aos técnicos Mauro Sergio Martinazo e Renato da Silva Moura.

À empresa Quark Medical pela doação do transdutor e apoio técnico.

Ao Eng. Leard Fernandes por entender as minhas dificuldades e trabalhar em conjunto

auxiliando e facilitando o desenvolvimento do meu projeto.

Ao *National Institutes of Health* (NIH) por financiar o projeto sobre efeitos biológicos do ultrassom do *Bioacoustics Research Laboratory - UIUC*, durante meu estágio.

“A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades.”
“The better part of one’s life consists of his friendships”

-Abraham Lincoln

RESUMO

Nos últimos anos, o uso do ultrassom em diagnóstico e terapia vem crescendo e novas técnicas vêm sendo aprimoradas e desenvolvidas para novos tipos de aplicações, como por exemplo, em tratamento alternativo de insuficiência cardíaca. O objetivo deste trabalho foi investigar efeitos biológicos (*in vitro* e *in vivo*) em decorrência de exposição do coração de ratos a ondas ultrassônicas (frequência central 1 MHz), a fim de identificar padrões de estimulação que possam ser deletérios ou que possam ser usados terapeuticamente para distúrbios do ritmo cardíaco. Nos experimentos *in vitro* 7 corações isolados perfundidos de ratas, foram estimulados por 30 s com *bursts* de intensidade variando entre 0,6 até 8,00 W. Foi observado efeito cronotrópico negativo (sem efeito inotrópico) mais consistente (15-20%) na frequência de estimulação de 3 Hz e intensidades entre 0,62 até 5,54 W, porém este efeito foi transitório e não dependeu do *duty cycle* utilizado. Observaram-se arritmias na presença do ultrassom, mas não houve variação significativa de temperatura. Nos experimentos *in vivo* foram utilizadas 20 ratas, os corações foram estimulados por 10 s com *bursts* de 2-3 MPa. Os experimentos *in vivo* foram divididos em 5 grupos cada um composto de 5 animais: 1) preliminar; 2) controle ultrassom; 3) ultrassom; 4) controle vagotomizado e 5) ultrassom vagotomizado. No grupo preliminar dos experimentos observou-se o efeito cronotrópico negativo do ultrassom (redução de ~7 % da frequência cardíaca basal logo após a aplicação do ultrassom), relatado previamente. Para os demais grupos, em que se tentou determinar uma possível variação na pressão arterial e a influência do sistema parassimpático sobre o efeito cronotrópico negativo, não foram observadas variações significativas das variáveis estudadas. Estudos adicionais são necessários para esclarecimento dos efeitos da aplicação do ultrassom de alta potência sobre o coração de ratos.

Palavras-chave: ultrassom de potência, efeitos biológicos, coração, efeito cronotrópico.

ABSTRACT

In recent years, the use of ultrasound in diagnosis and therapy is increasing and new techniques have been improved and developed for new applications as, for instance, in alternative treatment of heart failure. The goal of this study was to investigate the biological effects (in vitro and in vivo) on rat heart of ultrasound waves (1 MHz center frequency) in order to identify stimulatory patterns that may be damaging or that may be used therapeutically for heart rhythm disturbances. In the *in vitro* experiments, 7 isolated perfused rat hearts, were stimulated with ultrasound bursts for 30 s and intensity ranging from 0.6 to 8 W. Negative chronotropic effect was observed (without inotropic effect) more consistently (15-20%) at the stimulatory frequency of 3 Hz with intensities of 0.62 to 5.54 W but this effect was transient and not dependent on the duty cycle used. We observed arrhythmia in the presence of ultrasound, but no significant variation in temperature. In the *in vivo* experiments 20 rat hearts were stimulated for 10 s with ultrasound bursts of 2-3 MPa. The experiments were divided into five groups each consisting of 5 animals: 1) preliminary, 2) ultrasound control, 3) ultrasound, 4) vagotomy, control and 5) vagotomy, ultrasound. The preliminary group of experiments, we observed the negative chronotropic effect of ultrasound (~ 7% decrease in heart rate immediately after application of ultrasound), previously reported. In the other groups, in which we have tried to determine the possible variation in blood pressure and the influence of the parasympathetic system on the negative chronotropic effect, there were no significant changes in the variables studied. Additional studies are needed to clarify the effects of high power ultrasound application on rat heart.

Keywords: high power ultrasound, biological effects, heart, chronotropic effect.

Lista de Abreviaturas

APD	Área de Pesquisa e Desenvolvimento
bpm	Batimentos por minuto
CEB	Centro de Engenharia Biomédica
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CTR-US	Controle Ultrassom
CTR-VG	Controle Vagotomizado
DAR	<i>Division of Animal Resources</i>
DC	Débito cardíaco
ECG	Eletrocardiograma
EP	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FRP	Frequência de repetição de pulso
GL	Graus de Liberdade
LPCv	Laboratório de Pesquisa Cardiovascular
PZT	Zirconato Titanato de Chumbo
PRP	Período de repetição de pulso
RF	Radiofrequência
UIUC	<i>University of Illinois at Urbana-Champaign</i>
US	Ultrassom
US-VG	Ultrassom Vagotomizado
VDF	Volume diastólico final
VS	Volume sistólico (ejetado)
VSF	Volume sistólico final

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
3.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	7
3.2 INSTRUMENTAÇÃO E CALIBRAÇÃO.....	7
3.2.1 ANIMAIS	14
3.2.2 <i>SETUP</i> EXPERIMENTAL.....	16
3.2.3 EXPERIMENTOS COM CORAÇÃO PERFUNDIDO.....	18
3.3 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	20
3.3.1 CALIBRAÇÃO	20
3.3.2 <i>SETUP</i> EXPERIMENTAL.....	24
3.3.3 ANIMAIS	27
3.3.4 VAGOTOMIA BILATERAL.....	29
3.3.5 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA	30
3.3.6 INSERÇÃO DO TERMOPAR	31
3.3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	31
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	32
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS	33
4.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	33
4.1.1 EFEITO DA TEMPERATURA.....	33
4.1.2 EFEITOS DO ULTRASSOM SOBRE O CORAÇÃO PERFUNDIDO DE RATO.....	34
4.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	37
4.2.1 EFEITO DA TEMPERATURA.....	37
4.2.2 EFEITO DO ULTRASSOM SOBRE AS VARIÁVEIS MEDIDAS <i>IN VIVO</i>	38
4.2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	51
CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO	53
5.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	53
5.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	55
5.3 RESUMO E CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE A - PROTOCOLO EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	65
APÊNDICE B - SCRIPT EM AMBIENTE MATLAB	67
APÊNDICE C - MATERIAIS DOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	68
ANEXO 1– APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – CEUA/UNICAMP.....	70
ANEXO 2 -APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – IACUC/UIUC	71

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O ultrassom é uma modalidade de imagem médica que tem um importante valor em diagnóstico, sendo muito útil em uma variedade de aplicações (NELSON *et al.*, 2009). Em medicina, o ultrassom vem sendo aplicado tanto em diagnóstico quanto em tratamento de doenças. Sua grande aceitação no meio médico estimula a pesquisa para aprimoramento de técnicas já existentes, bem como para desenvolvimento de novas aplicações (ECHT *et al.*, 2006, LEE *et al.* 2007, LEE *et al.* 2009, BUIOCHI, 2011). O desenvolvimento de novos dispositivos e transdutores, bem como de *softwares* específicos, vem contribuindo fortemente para o aumento da utilização do ultrassom (US)(FERNANDES *et al.*, 2012), tornando possível a visualização de inúmeras estruturas musculares e cardíacas, incluindo o interior de vasos sanguíneos. Atualmente, além de auxiliar no diagnóstico de lesões de partes moles e identificação de estruturas, o ultrassom tem sido empregado na avaliação de estruturas articulares comprometidas por doenças reumáticas ou como guia para a realização em diversos procedimentos. O estudo do ultrassom vem crescendo a cada dia por se tratar de um método acessível, não-invasivo, que não utiliza radiação ionizante, com equipamentos que podem ser portáteis, de custo relativamente baixo e que permitem uma avaliação dinâmica ou uso terapêutico.

O ultrassom terapêutico baseia-se em sua habilidade de produzir efeitos biológicos. Há um crescente emprego do ultrassom para fins de fisioterapia, sonoforese, trombólise, hipertermia, hemostasia e litotripsia. De acordo com os parâmetros empregados, o ultrassom pode interagir de diversas formas com os diferentes tecidos biológicos, sendo inclusive capaz de exercer efeitos antagônicos, como restabelecer o fluxo sanguíneo (trombólise – baixa intensidade) e estancar o sangramento (hemostasia – alta intensidade). Mantendo-se a mesma intensidade, os efeitos térmicos aumentam conforme a frequência do ultrassom aumenta, enquanto a possibilidade de ocorrência de cavitação (formação seguida de imediata implosão de uma bolha, ou população de bolhas, estimuladas quando em movimento por um campo ultrassônico) é maior a frequências

mais baixas (BAILEY *et al.*, 2003).

O uso do ultrassom como fonte alternativa de energia para estimulação de miocárdios de porcos foi proposto por Towe & Rho (2006). Buscando estabelecer a possibilidade de uso de ultrassom para estimulação marca-passo cardíaca, os autores utilizaram um transdutor cerâmico do tipo PZT-5H, operando a 70 kHz, com pulsos de duração de 5 ms e amplitude de 3 MPa com frequência de repetição de pulso de 1,4 a 2 Hz (80 a 120 batimentos por minuto, bpm) para irradiar o miocárdio de porcos. As curvas que relacionam a resposta com a intensidade do estímulo e que caracterizam a eficiência do ultrassom como marca-passo, foram semelhantes às obtidas por estimulação elétrica.

A relevância do estudo de efeitos do ultrassom sobre os tecidos biológicos reside no fato de que pode ser aplicado em procedimentos terapêuticos limitando exposições diagnósticas indesejadas. A ocorrência de efeitos biológicos depende de combinações de parâmetros acústicos, as quais devem ser determinadas experimentalmente (PETRISHCHEV *et al.*, 2003, TOWE & RHO, 2006).

O ultrassom vem sendo testado como alternativa no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca avançada (ECHT *et al.*, 2006, LEE *et al.* 2007, LEE *et al.* 2009). Os marca-passos tradicionais fazem uso de corrente elétrica para estimulação cardíaca, podendo ocasionar efeitos deletérios sobre o ventrículo. O uso alternativo do ultrassom no tratamento de insuficiência cardíaca avançada utiliza a conversão de energia ultrassônica em energia elétrica, permitindo eliminar cabos e minimizar os problemas ocasionados com o uso do marca-passo tradicional (LEE *et al.*, 2009)

Atualmente, desfibriladores elétricos são utilizados para reverter arritmias cardíacas. De acordo com o funcionamento dos desfibriladores, sua descarga visa à despolarização da membrana de um grande número de células cardíacas, resultando na re-sincronização da sua atividade elétrica. Campos elétricos de alta intensidade gerados no tecido cardíaco podem causar danos (reversíveis ou permanentes) devido à eletroporação, que pode gerar alterações elétricas e contráteis, e mesmo sobrecarga de Ca^{2+} e morte celular (e.g., KNISLEY & GRANT, 1995; TUNG, 1996; KRAUTHAMER & JONES, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Além da possibilidade de desfibrilação por ultrassom (SMAILY *et al.*, 1981), há relatos de terapia gênica cardíaca (PORTER & XIE, 2001), trombólise para tratamento de síndrome coronariana aguda (SINGH *et al.*, 2003), terapia ablativa para tratamento de arritmias (DENG *et*

al., 2005), aplicação do ultrassom como marca-passo cardíaco (TOWE & RHO, 2006) e intervenção não-farmacológica em casos de insuficiência cardíaca, por provocar efeitos inotrópico e lusitrópico positivos como resultado da aplicação do ultrassom (KUMA *et al.*, 2006).

O ultrassom terapêutico pode produzir efeitos térmicos em diferentes tecidos. Experimentos com tecido não perfundido demonstraram que o ultrassom de 1 ou 3 MHz pode aumentar a temperatura dos tecidos como fígado e tendão patelar (ASHTON *et al.* 1998). Por outro lado, os efeitos não térmicos podem ser causados pela cavitação ou *streaming* acústico (corrente constante de fluido impulsionada pela absorção de oscilações acústicas de alta amplitude) (WILLIAMS, 1987). O ultrassom de alta potência vem sendo usado para o tratamento de adenocarcinoma prostático em ratos, pois é capaz de induzir lesões *in vivo* pela focalização de um feixe ultrassônico sobre uma área alvo específica no interior do tecido. Para uma dada quantidade de energia, a destruição tecidual pode envolver dois efeitos físicos diferentes dependendo da intensidade acústica: um efeito térmico, que pode ser obtido usando longos períodos de exposição e baixas intensidades ultrassônicas, e pela cavitação, que é obtida como picos de intensidade muito altos (CHAPELON *et al.*, 1992).

Quanto à aplicação de ultrassom no tecido cardíaco, há relatos de redução do limiar de excitação elétrica (SALZ *et al.*, 1997) e produção de efeito inotrópico positivo em preparações miocárdicas isoladas (MORTIMER *et al.*, 1980, FORESTER *et al.*, 1982, MORTIMER *et al.*, 1984, FORESTER *et al.*, 1984, FORESTER *et al.*, 1985, DINNO *et al.*, 1989, GREENBERG *et al.*, 2000, PETRISHCHEV *et al.*, 2002, PETRISHCHEV *et al.*, 2003). Por outro lado, há relato de geração de atividade elétrica anormal no coração pelo ultrassom (DALECKI *et al.*, 1991, DALECKI *et al.*, 1993). Transdutores podem gerar US de alta potência que tem maior probabilidade de produzir efeitos sobre a atividade cardíaca, seja US da ordem de kHz ou de MHz (BUIOCHI, 2011).

À medida que aumenta a amplitude da onda, as partículas do meio de propagação deixam de apresentar somente comportamento oscilatório, e começa a ocorrer escoamento do fluido (por exemplo, sangue ou líquidos dentro ou fora das células submetidas ao US). Esse efeito não-linear é chamado de correnteza acústica. A energia ultrassônica absorvida leva à ocorrência de uma força, a qual empurra o fluido na direção do feixe ultrassônico (FISH, 1994), sendo a velocidade do fluxo proporcional ao quadrado da frequência de ressonância do ultrassom. Tem sido atribuído à correnteza acústica um papel importante na produção de efeitos biológicos *in vitro* do ultrassom

(SALZ *et al.*, 1997).

As ondas ultrassônicas são conhecidas por interferir na atividade cardíaca de tartarugas, cães, rãs, camundongos e porcos *in vivo* (HARVEY, 1929; SMAILYS *et al.*, 1981; DALECKI *et al.*, 1997; MACROBBIE *et al.*, 1997; TOWE & RHO, 2006). Quando o ultrassom é aplicado *in vitro*, deve-se considerar que há uma menor influência de mecanismos homeostáticos. Na condição *in vivo*, alterações nos meios intra- e extracelular podem desencadear respostas que podem contribuir com ou atenuar os efeitos biológicos decorrentes da ação direta do ultrassom. A resposta fisiológica a efeitos térmicos compreende aumento do fluxo sanguíneo, aceleração do metabolismo tecidual, aumento da permeabilidade de membranas e alterações no potencial de membrana (ROBINSON & BUONO, 1995). Recentemente, observou-se que a aplicação *in vivo* transtorácica de ultrassom de 1 MHz a ratos provocou efeito cronotrópico negativo sem danos aparentes ao tecido cardíaco (BELASSIANO *et al.*, 2011).

Um intrigante efeito possível na ecocardiografia de contraste do miocárdio é a geração de arritmia cardíaca, que ocorre em altos picos rarefacionais de amplitude de pressão. A arritmia mostra-se como complexos QRS prematuros no sinal de eletrocardiograma, que ocorrem coincidentemente com a exposição do tecido ao ultrassom e cessam após sua aplicação (MILLER *et al.*, 2009). Arritmias são induzidas principalmente quando o agente de contraste interage com o ultrassom durante a exposição, o que pode ter uma relação causal com a geração das arritmias (ZACHARY *et al.*, 2002).

Em múltiplos experimentos em cérebro de coelho, utilizando pulsos ultrassônicos com frequência de 1,72 MHz e intensidade de 7000 W/cm², Vykhodtseza *et al.* (1995) mostraram que os efeitos sobre a morfologia do tecido variaram de nenhuma observação de destruição tecidual local, até abrupta hemorragia, causando a morte do animal. A severidade do dano tecidual foi tanto maior quanto maior a duração do pulso e sua frequência de repetição (VYKHODTSEZA *et al.*, 1995).

Estudo *in vivo* demonstrou a formação de gases nas cavidades de cobaias durante a aplicação de ultrassom de 0,75 MHz com intensidade de 680 mW/cm², porém o estudo não incluiu resultados histológicos (TER HAAR *et al.*, 1982).

Foi demonstrado em estudo *in vivo* que o ultrassom de alta intensidade e frequência de 1,2 MHz causou alterações de ritmo cardíaco de anfíbios (DALECKI *et al.*, 1993). Estudo em coração isolado perfundido de rato excitado com *bursts* de ultrassom com intensidade de 1,52

W/cm² e presença de cavitação acústica (durante 30 s) mostrou uma significativa diminuição da pressão arterial medida 2 min após a aplicação do ultrassom. Nenhum efeito do ultrassom foi observado abaixo dessa intensidade. Com o auxílio de pulsos de ultrassom (duração 50 ms e intensidade até 5 W/cm²), o coração pôde ser excitado ritmicamente e seu automatismo foi suprimido. Foi considerado que a cavitação acústica pode induzir, localmente, lesões reversíveis do miocárdio que poderiam ser responsáveis pela arritmogênese (ZAKHAROV *et al.*, 1991). Em experimentos realizados em corações isolados de ratos Wistar (BUIOCHI, 2011), foi observada geração esporádica de arritmia usando-se um transdutor de 65 kHz, e aumento da frequência espontânea, acompanhada por redução da força de contração do miocárdio, usando-se um transdutor de 1 MHz em exposição contínua prolongada.

A proposta geral deste trabalho foi estudar a resposta à aplicação do ultrassom de alta intensidade em corações de ratos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, buscando observar os possíveis efeitos biológicos envolvidos, bem como possíveis mecanismos envolvidos na produção desses efeitos.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

1. Estudar o efeito do ultrassom de alta potência sobre as atividades cronotrópica e inotrópica do coração isolado perfundido de rato, com foco na identificação de parâmetros de estimulação efetivos em produzir alterações funcionais.
2. Investigar efeitos cardiovasculares produzidos pela aplicação *in vivo* do ultrassom de alta potência a ratos, buscando investigar o papel de reflexos mediados pela eferência autonômica parassimpática.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.2 INSTRUMENTAÇÃO E CALIBRAÇÃO

Os equipamentos usados nos experimentos *in vitro* foram: osciloscópio (modelo DSO5012A, *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA), gerador de sinais (modelo DG 1022, *Rigol Technologies Inc.*, Oakwood Village, OH, EUA), amplificador de RF (Radiofrequência) (modelo 75A-250, *Amplifier Research*, Souderton, PA, EUA), amplificador de sinais fisiológicos (desenvolvido na APD do CEB/UNICAMP, OS 01-2575), transdutor ultrassônico (modelo Pro Seven 997, Quark Medical, Brasil), transdutor isométrico de força (Myograph F-60 Narco Bio Systems, Houston, TX, EUA) e placa de aquisição (NI USB – 6009, National Instruments) conectada a um microcomputador (Inspiron 580, Dell, Round Rock, TX, EUA)

A) Gerador de sinais

O gerador de sinais foi utilizado para gerar *bursts* (salvas de senóides). A opção pelo modo *burst* deveu-se ao fato de que, no modo contínuo há maior possibilidade de causar efeitos térmicos. No modo pulsado o efeito térmico é minimizado. Utilizando o modo *burst* (Figura 3.1), calculou-se o *duty cycle* correspondente a cada número de ciclos e frequência escolhidos, Equação 1.

$$duty\ cycle = \frac{\tau}{t} \quad (1)$$

onde:

τ = intervalo de tempo no qual a função é não-nula dentro de cada período

t = intervalo entre pulsos.

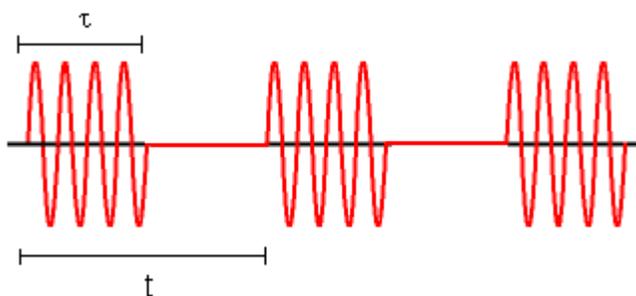


Figura 3.1: Salvas de senóides.

Nos experimentos, utilizou-se um transdutor de 1 MHz e, portanto, o período T da onda ultrassônica, era 1 μ s. Para 5000 ciclos da onda ultrassônica, obtém-se um $\tau = 5,0$ ms. Para $t = 500$ ms (frequência de 2 Hz), aplicando a Equação 1, tem-se um *duty cycle* de 1%. Na Tabela 3.1, são mostrados os valores de *duty cycle* e número de ciclos utilizados para frequência de estimulação de 2Hz.

Tabela 3.1: Valores de *duty cycle* e número de ciclos utilizados para frequência de estimulação de 2 Hz e frequência da onda ultrassônica de 1 MHz.

Duty Cycle (f=2 Hz)	Número de ciclos
1,0%	5000
2,5%	12500
5,0%	25000
10,0%	50000

B) Amplificador de RF

O amplificador utilizado apresenta limitações de especificação, como, por exemplo, amplificação máxima de 49 dB e potência do sinal de entrada de 1 mW para resistência de 50Ω . Dessa forma, a análise do comportamento do ganho do amplificador em função da tensão de saída do gerador de sinais foi importante para se evitar sobrecarga de tensão na entrada do amplificador de potência (Figura 3.2). Como a tensão de saída no amplificador era muito alta, era inviável medi-la apenas com o osciloscópio. A fim de evitar erros nas medições, todos os equipamentos, como cabos e transdutor, foram casados com impedância de 50Ω . Dessa forma, foi utilizado um *shunt* em paralelo com o transdutor de 1 MHz, para a realização da medição (Figura 3.3). O *shunt* foi composto de dois resistores, 1Ω e $1 \text{ k}\Omega$. Medindo-se a tensão sobre o resistor de 1Ω , tem-se a corrente no ramo do *shunt* e, portanto, a tensão de saída do amplificador de potência, aplicado ao transdutor (impedância de 50Ω). Dessa forma, foi possível construir uma tabela da tensão de saída do amplificador de potência em função da tensão de entrada (saída do gerador de sinais) (Tabela 3.2).

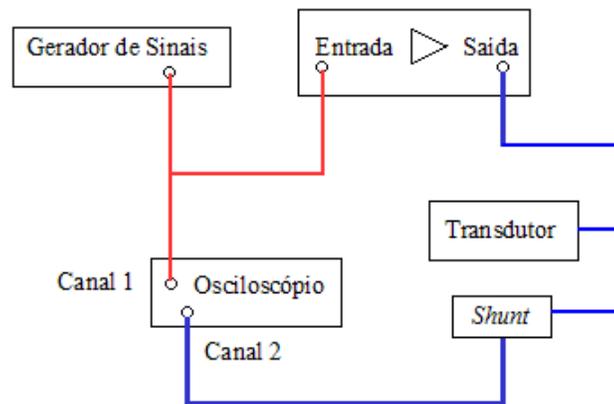


Figura 3.2: Arranjo experimental para medição do sinal de excitação do transdutor (sinal de saída do amplificador de RF) em função do sinal de saída do gerador de sinais. O sinal de entrada no amplificador (saída do gerador de sinais) é visto no canal 1 do osciloscópio e o sinal de saída do amplificador, medido sobre o resistor *shunt* e multiplicado por 1001 (soma dos resistores em paralelo com o transdutor), é visto no canal 2).

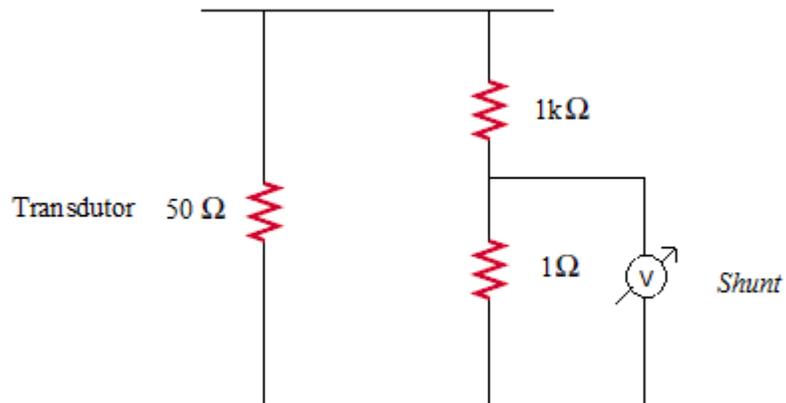


Figura 3.3: Transdutor de ultrassom de 50 Ω e *shunt* em paralelo.

Os valores da Tabela 3.2 representam a tensão de saída medida sobre o transdutor de 50 Ω para os diferentes *duty cycles*.

Tabela 3.2: Tensão de saída medida sobre o transdutor de 50 Ω para os diferentes *duty cycles*.
Saída do Amplificador de RF (Vp)

Saída do Gerador de sinais (Vpp)	Duty Cycle= 1,0%	Duty Cycle= 2,5%	Duty Cycle= 5,0%	Duty Cycle= 10%
0,5	72	66	60	80
1,0	128	126	140	140
1,5	176	162	220	220
2,0	196	196	320	320
2,5	248	240	484	480
3,0	276	392	680	800

C) Calibração do transdutor

Com o auxílio de uma balança digital de força de radiação modelo UPM-DT-10 (Ohmic Instruments, EUA; Figura 3.4), e usando água destilada e desgaseificada, foi feita a calibração do transdutor de 1 MHz (em termos de potência mecânica em Watts), na frequência de 2 Hz, variando o *duty cycle* e a tensão de saída do gerador de sinais, em função da média da potência elétrica aplicada no transdutor. Foram realizadas cinco repetições, com erro de $\pm 0,01$ Vpp (Tabela 3.3).



Figura 3.4: Balança digital de força de radiação

Tabela 3.3: Potência mecânica média (W) gerada pelo transdutor em função da tensão de saída do gerador de sinais para diferentes valores de *duty cycles*.

Potência mecânica (Watts)						
<i>Duty Cycle</i>	Tensão de saída do gerador de sinais					
	0,5 Vpp	1,0 Vpp	1,5 Vpp	2,0 Vpp	2,5 Vpp	3,0 Vpp
1,0%	0,12	0,28	0,44	0,62	0,76	0,86
2,5%	0,20	0,48	0,94	1,42	1,76	1,98
5,0%	0,26	0,90	1,84	2,82	3,48	3,98
10,0%	0,50	1,78	3,76	5,54	6,98	8,00

Com a mesma balança digital de ultrassom, verificou-se a frequência de operação do transdutor ao redor de 1 MHz pela variação de massa equivalente de um volume de água destilada e desgaseificada. A análise foi feita com o gerador de sinais em *burst*, com tensão de saída de 2 Vpp e 10% *duty cycle*. Variou-se a frequência entre 900 kHz e 1,1 MHz. Foi encontrado que a frequência de ressonância do transdutor era de 1,004 MHz, ou seja, é o ponto da potência

mecânica máxima aplicada pelo transdutor (Figura 3.5). Neste trabalho, utilizou-se sempre 1 MHz, desprezando-se os milésimos.

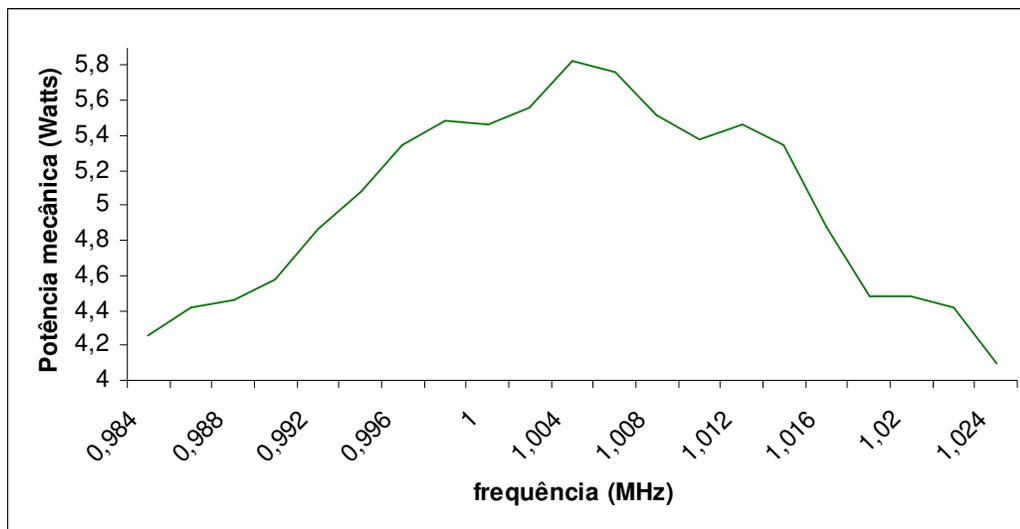


Figura 3.5: Potência mecânica do transdutor em função da frequência (ressonância em 1,004 MHz).

D) Atenuação da câmara de acrílico

A câmara de perfusão do coração, feita em acrílico, é cilíndrica e tem uma parede desgastada para obtenção de superfície plana, na qual foi acoplado o transdutor para aplicação de ultrassom. Esta parede tem espessura de 3,2 mm. Foi confeccionada uma placa de acrílico de mesma espessura da parede plana e posicionada no interior da balança de força de radiação (modelo UPM-DT-10, *Ohmic Instruments*, E.U.A.) para a análise da atenuação causada por este material. Foi possível analisar a pressão mecânica aplicada na placa de acrílico em função da tensão e *duty cycle*. A placa de acrílico foi posicionada no interior da balança de força de radiação, acima do cone metálico com a face perpendicular à face do transdutor. Foram feitas medidas sem a placa de acrílico e com a placa de acrílico (Figura 3.6), o máximo da atenuação ocorreu para tensões mais altas. A Tabela 3.5 apresenta o valor percentual da atenuação com (Tabela 3.4) e sem (Tabela 3.3) a placa de acrílico imitando a parede da câmara.

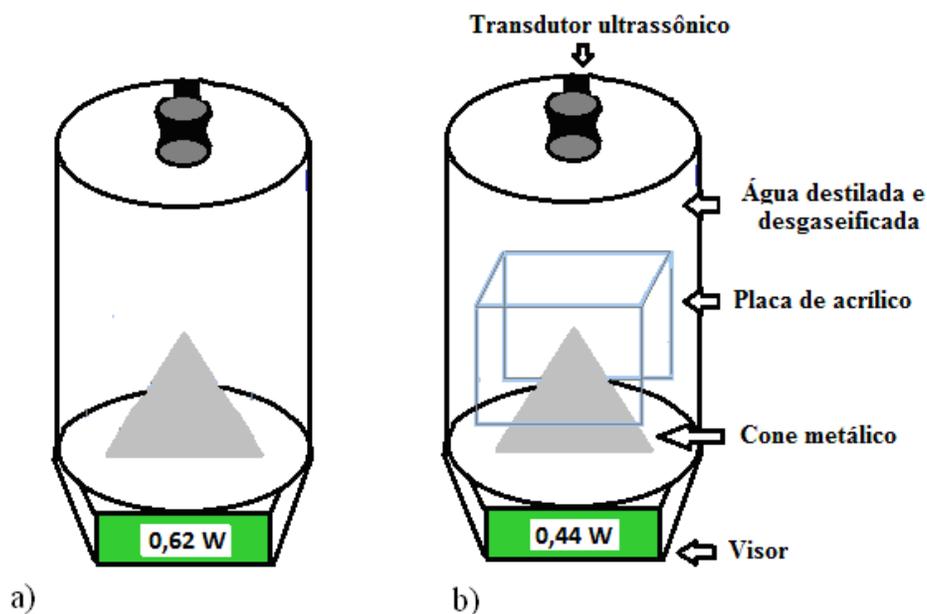


Figura 3.6: Diagrama para medição da atenuação do ultrassom causado por placa de acrílico de mesma espessura que a câmara de perfusão. As medições são realizadas (a) sem e (b) com a placa de acrílico entre o transdutor e o cone metálico da balança ultrassônica. A placa de acrílico fica perpendicular à face do transdutor ultrassônico.

Tabela 3.4: Potência mecânica medida pela balança ultrassônica com a placa de acrílico inserida, para diferentes valores de tensão e *duty cycle* no gerador de sinais.

<i>Duty Cycle</i>	Potência Mecânica (Watts)		
	2,0 Vpp	2,5 Vpp	3,0 Vpp
1,0%	0,44	0,52	0,56
2,5%	1,10	1,30	1,40
5,0%	2,14	2,52	2,74
10,0%	4,28	5,06	5,46

Tabela 3.5: Percentual de atenuação do sinal ultrassônico pelo acrílico em função da potência mecânica aplicada (comparativamente aos valores da Tabela 3.3).

<i>Duty Cycle</i>	Atenuação (%)		
	2,0 Vpp	2,5 Vpp	3,0 Vpp
1,0%	29,0	31,6	34,9
2,5%	22,5	26,1	30,0
5,0%	24,1	27,6	31,5
10,0%	22,7	27,5	31,7

Foi observado que a câmara de acrílico atenuou consideravelmente a intensidade do ultrassom (de 22% até aproximadamente 35%), dependendo da tensão inicial e do *duty cycle* aplicados ao transdutor ultrassônico.

3.2.1 ANIMAIS

Os experimentos de aplicação de ultrassom ao coração isolado de ratos foram realizados no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv), da Área de Pesquisa e Desenvolvimento (APD) do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP.

Os protocolos de manutenção e experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia, IB/UNICAMP (protocolo nº 2479-1, ANEXO 1).

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, de aproximadamente um ano de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), que foram mantidas no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB/UNICAMP) em gaiolas plásticas coletivas (2-3 animais), com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*. A eutanásia foi realizada por exsanguinação após concussão cerebral. Em seguida, após toracotomia, o coração foi dissecado e colocado em um recipiente contendo solução de perfusão. Foi realizada a canulação da aorta (cânula fixa à base da câmara de perfusão, ver a seguir), e o coração foi perfundido com solução heparinizada. A seguir, foi inserido um gancho de aço inoxidável no ápice dos ventrículos, que foi conectado a um fio de algodão posteriormente acoplado ao transdutor de tensão, para medição da força desenvolvida. A base da câmara foi então invertida, fixada a um suporte, e rosqueada ao corpo da câmara. O fio preso ao gancho inserido na parede ventricular foi conectado ao transdutor de força. Após 30 minutos para estabilização da atividade espontânea e das contrações, os experimentos foram iniciados.

A base da câmara de perfusão cilíndrica de acrílico é removível e contém a cânula através da qual flui a solução nutritiva. Para a perfusão do coração, foi usada a solução de Krebs-Henseleit modificada (composição: 115 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,5 mM CaCl₂.2H₂O; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM MgSO₄.7H₂O; e 11,1mM glicose; pH 7,4), aquecida à temperatura de 38°C (temperatura na câmara: ~30 °C) e saturada com carbogênio (95%O₂/5%CO₂). A solução

fluía para a câmara por gravidade a um fluxo de aproximadamente 8 ml/min, no interior de um tubo de polietileno envolvido por uma tubulação na qual circulava água aquecida em sentido contrário ao do fluxo da solução. Água aquecida também circulava ao redor da parede do reservatório da solução, por meio de uma bomba de aquecimento e circulação de água (desenvolvida na APD/CEB/UNICAMP, OS 02/4785). A solução entrava pela cânula situada na base da câmara, e daí para a aorta e artérias coronárias (perfusão retrógrada). O coração permanecia imerso na solução que dele efluía após passar pelos vasos coronários. O nível de solução na câmara foi mantido constante por aspiração através de uma cânula conectada a uma bomba de vácuo (Figura 3.7).



Figura 3.7: Bancada de experimentos: reservatório da solução, bomba de circulação e aquecimento de água e transdutor de força.

O transdutor ultrassônico de 1 MHz foi posicionado na face plana da câmara de acrílico, e foi utilizado gel para o casamento de impedância transdutor/face da câmara (Figura 3.8).

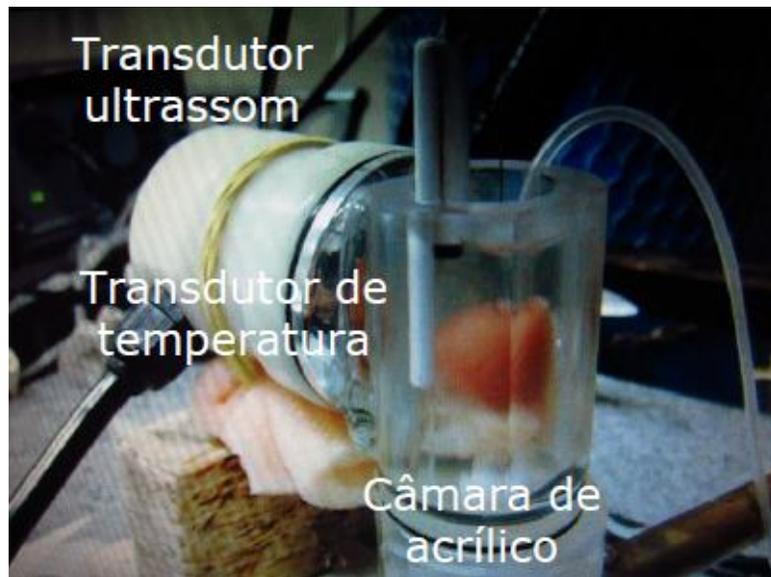


Figura 3.8: Transdutor ultrassônico em contato com a câmara de acrílico, que contém o coração em seu interior.

3.2.2 *SETUP* EXPERIMENTAL

Para a aplicação de ultrassom ao coração isolado de ratos foi utilizado o *setup* experimental mostrado no diagrama na Figura 3.9.

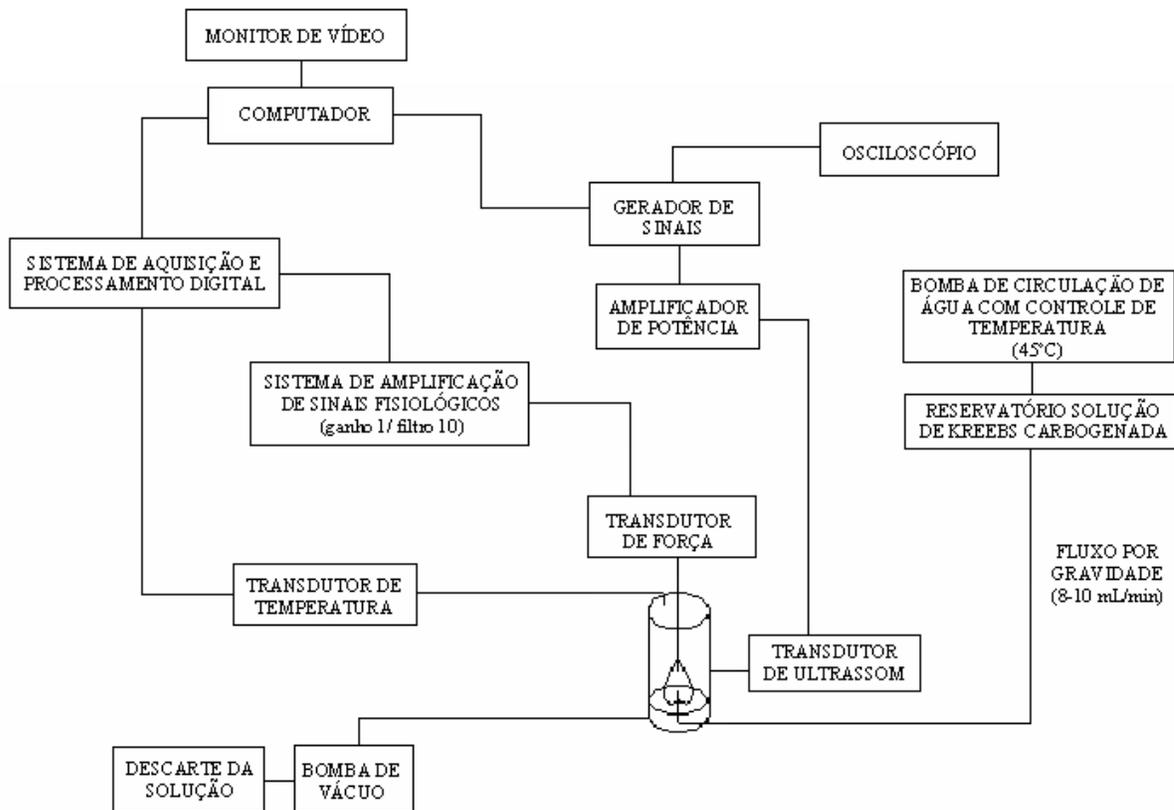


Figura 3.9: Diagrama em blocos do *setup* experimental utilizado para estimulação do coração perfundido.

A tensão desenvolvida pelo coração (isto é, a diferença entre o valor de pico sistólico e o valor diastólico) foi monitorada a partir do registro das contrações espontâneas desenvolvidas. Antes do início de cada experimento, o transdutor de força era calibrado (*offset zerado*). O sinal de força de contração foi alimentado a um sistema de amplificação (desenvolvido na APD/CEB/UNICAMP) para aquisição do sinal fisiológico. Este último foi baseado em uma placa de aquisição conectada a um microcomputador com *software LabVIEW 9.0.1*. Para os experimentos preliminares, foi desenvolvido um programa utilizando o *software MATLAB™ 7.10* para registro simultâneo das contrações e do período de aplicação do ultrassom (Figura 3.10). Foi também implementado o modo de tacografia, no qual é possível ter-se o registro direto do número de contrações por minuto durante cada seqüência experimental. Na Figura 3.10, a forma de onda quadrada é o sinal de uma bateria: o valor maior que zero indica o período de aplicação do ultrassom.

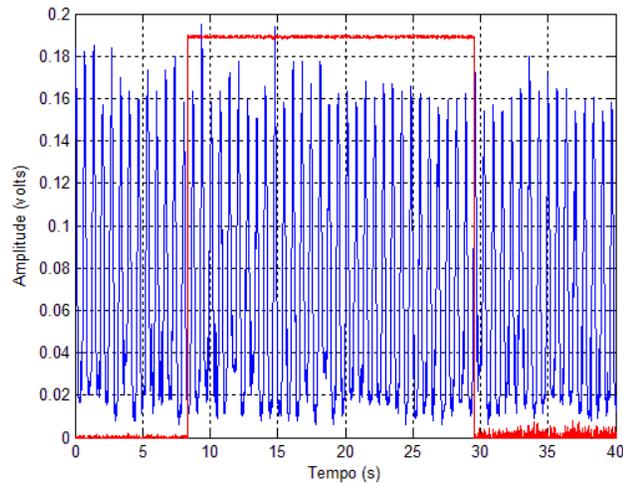


Figura 3.10: Registro de contrações espontâneas (tensão de saída do amplificador de sinal) desenvolvidas por coração isolado de rato durante estimulação com ultrassom com 0,6 W e *duty cycle* de 1% e período de repetição de pulso de 333 ms. O traçado positivo em vermelho indica o tempo de aplicação do ultrassom.

3.2.3 EXPERIMENTOS COM CORAÇÃO PERFUNDIDO

Nesta etapa foram utilizados 7 corações, e a mesma metodologia descrita anteriormente. Dois protocolos de estimulação (A e B) foram elaborados para diferentes combinações de *duty cycle* e potência. Foi utilizado *duty cycle* variando de 1, 2,5, 5 e 10% com FRP variável (variando desde a frequência acima da frequência cardíaca do coração perfundido até 2 Hz abaixo da frequência cardíaca) por 30 segundos (o total de aplicação foi de 90 s com intervalo de 30 s entre as diferentes FRP), com potência variando de 0,6 a 5,54 W . O protocolo de estimulação ultrassônica está mostrado na Figura 3.11.

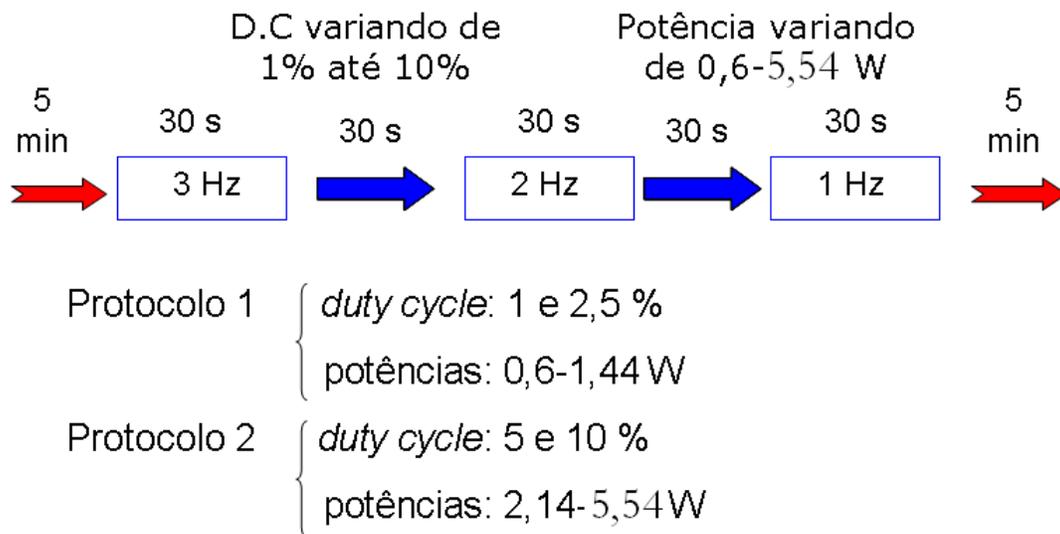


Figura 3.11: Protocolo de estimulação ultrassônica dos experimentos *in vitro*.

A análise gráfica dos dados, que anteriormente foi feita utilizando programa desenvolvido em MATLAB, passou a ser realizada nestes experimentos com o *software Ultrasound System Stimulation*, desenvolvido em plataforma LabVIEW. Este programa também permite o controle da aquisição do sinal e do padrão temporal da estimulação, bem como conta com ferramentas estatísticas para posterior análise de dados (FERNANDES *et. al*, 2012).

As variáveis medidas e analisadas foram: frequência espontânea em ritmo regular e contrações arrítmicas, e força de contração desenvolvida (i.e., tensão mecânica de pico menos tensão diastólica; Figura 3.12).

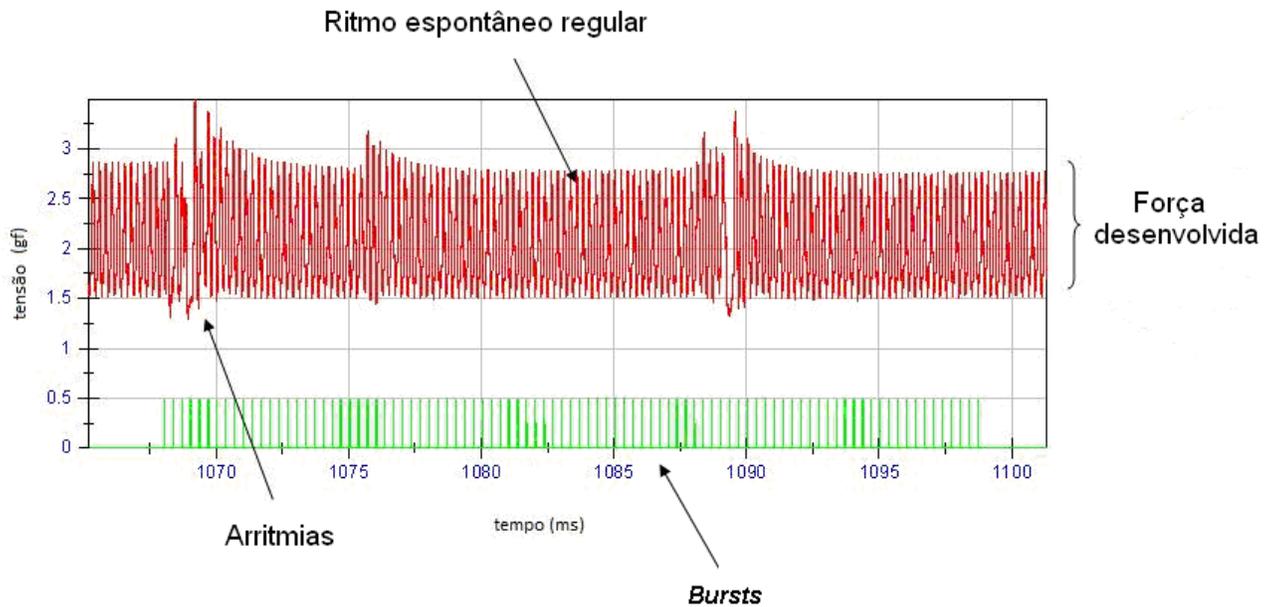


Figura 3.12: Traçado de contrações desenvolvidas por um coração isolado perfundido de rato, no qual são indicadas a tensão desenvolvida e trechos do traçado nos quais foram estimadas frequências espontânea regular e de arritmias e salvas de senoides (*bursts*).

3.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.3.1 CALIBRAÇÃO

A) Calibração do transdutor ultrassônico

As calibrações foram conduzidas em um tanque acústico contendo água destilada, degaseificada a 22°C. As calibrações foram realizadas em uma profundidade de 10 mm, que corresponde à profundidade do tórax na qual se localiza o coração dos animais (Figura 3.13). Foi utilizado um micromanipulador Daedal 2 (desenvolvido no *Bioacoustics Research Laboratory*, Urbana-Champaign, EUA) que permite a movimentação em três eixos de translação (2 μm de precisão) e em torno dos eixos angulares (precisão de 0,02 graus). O gerador de sinais (modelo 3310A, Hewlett Packard Co., Palo Alto CA, EUA), cuja saída era ligada à entrada de um amplificador de potência (modelo ENI A150, *Electronic Navigation Industries*, Rochester NY, EUA), excitava o transdutor com *bursts* de 50 ciclos e amplitudes de 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 V_{pp} . O transdutor foi posicionado a 1 cm do hidrofone (hidrofone calibrado de PVDF, GEC Marconi Y-34-3598 EW295, Chelmsford, Inglaterra). Para o transdutor de 1 MHz, a

relação entre tensão elétrica medida e pressão é 40 nV/Pa; além disso, no *Bioacoustics Research Laboratory (UIUC)* havia um programa desenvolvido em MATLAB para conversão tensão/pressão que foi utilizado para se calcular as pressões utilizadas neste trabalho. As respostas do transdutor estão apresentadas na Figura 3.14. As medições foram feitas no campo próximo para simular a distância do transdutor ao coração do rato (~1cm), podendo ocorrer, no entanto, reverberações do ultrassom entre a face do transdutor e a face do hidrofone; essas reverberações podem ocorrer também nos experimentos *in vivo*.

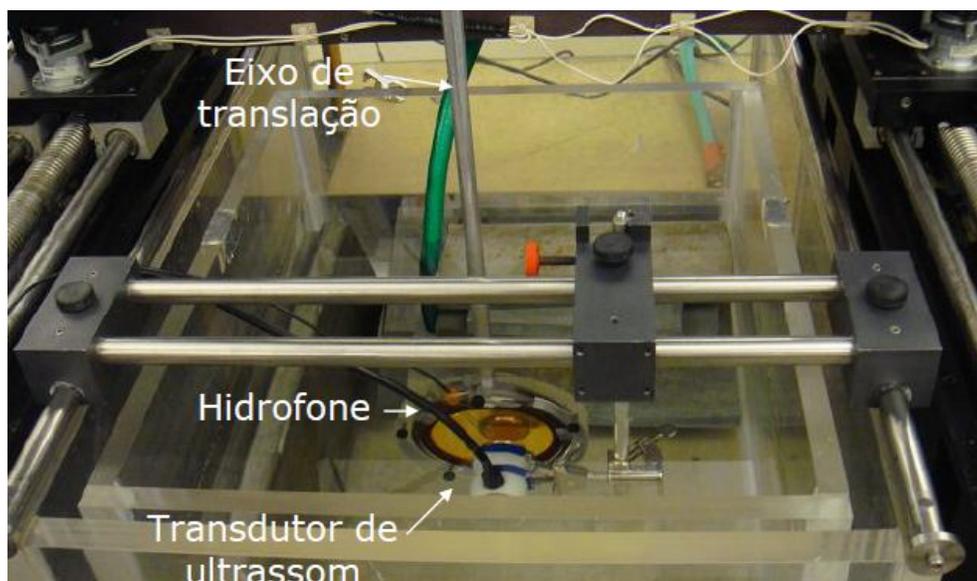


Figura 3.13: Tanque acústico contendo transdutor ultrassônico posicionado a 10 mm do hidrofone.

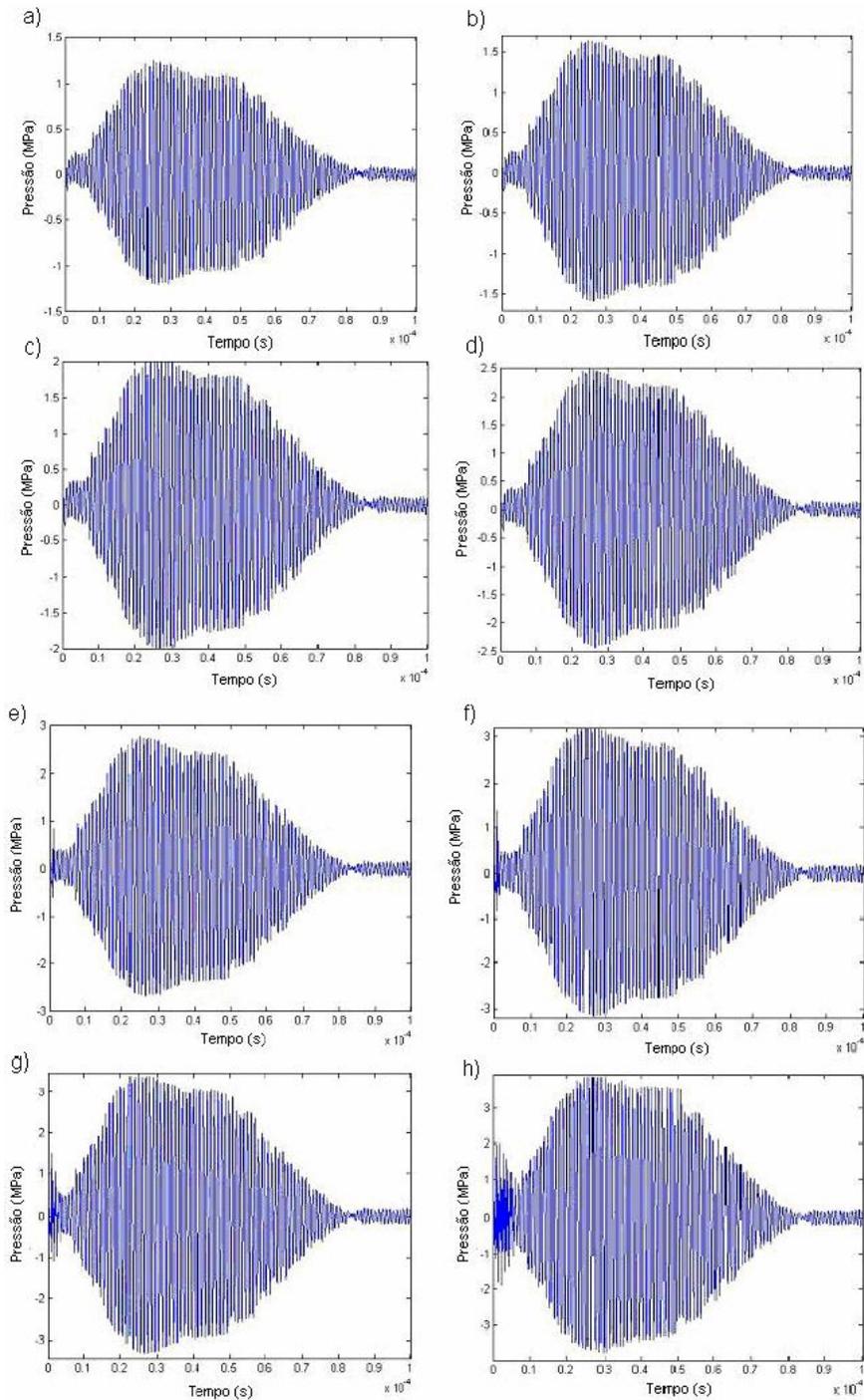


Figura 3.14: Sinal detectado pelo hidrofone quando o transdutor de ultrassom é excitado com *bursts* de 50 ciclos nas amplitudes: (a) $75 V_{pp}$, (b) $100 V_{pp}$, (c) $125 V_{pp}$, (d) $150 V_{pp}$, (e) $175 V_{pp}$, (f) $200 V_{pp}$, (g) $225 V_{pp}$, e (h) $250 V_{pp}$.

Foi realizado o mapeamento do campo acústico no plano XY utilizando os mesmos equipamentos citados anteriormente nesta seção, com o hidrofone posicionado a 1 cm da face do

transdutor. O transdutor foi excitado com *bursts* de 50 ciclos e amplitude de $50 V_{pp}$, e obteve-se uma pressão pico espacial temporal médio de aproximadamente 0,8 MPa (Figura 3.15) e campo acústico como mostrado na Figura 3.16.

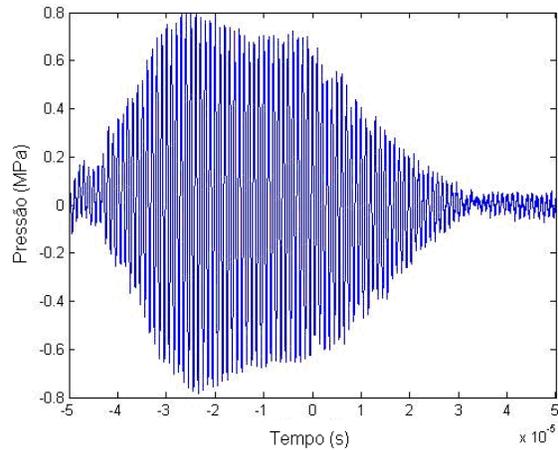


Figura 3.15: Sinal detectado pelo hidrofone quando o transdutor é excitado com *bursts* de 50 ciclos com amplitude de $50 V_{pp}$, com pressão pico espacial médio temporal de aproximadamente 0,8 MPa.

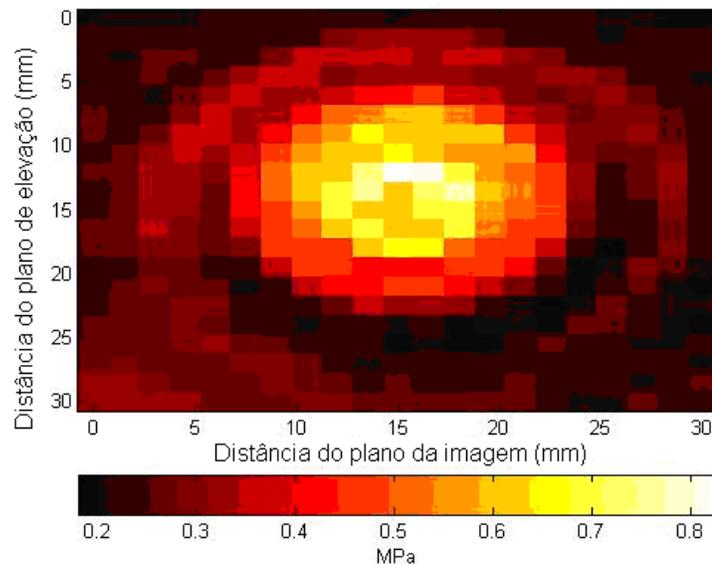


Figura 3.16: Campo acústico gerado pelo transdutor de 1 MHz quando excitado com *bursts* de 50 ciclos com amplitude de $50 V_{pp}$.

A) Calibração do transdutor de pressão arterial

Antes de se utilizar o transdutor de pressão, utilizado para medição da pressão arterial em ratos, era necessário sincronizar a tensão elétrica da unidade de controle (Samba 200, Samba Sensor, Vastra Frolunda, Suécia) com o sistema de coleta de dados. Para isso, foram ajustados na unidade de controle a tensão que seria aplicada e os limites de pressão mínimo e máximo desejados. Além disso, era necessário calibrar o transdutor de pressão, que era imerso numa proveta contendo água destilada. Após selecionar a unidade de medida (cm H₂O), calibrou-se o transdutor pela diferença do sinal obtido na profundidade de 10 cm e na superfície da água.

3.3.2 SETUP EXPERIMENTAL

O diagrama em blocos é apresentado na Figura 3.17. A instrumentação utilizada consistiu de:

a) um transdutor ultrassônico de terapia de 1 MHz (modelo Pro Seven 997, Quark Medical, Brasil) controlado por um gerador de função (modelo 3310A, Hewlett Packard Co., Palo Alto CA, EUA) e excitado por um amplificador de potência (modelo ENI A150, *Electronic Navigation Industries*, Rochester NY, EUA);

b) sistema de imagem de ultrassom de alta frequência (modelo Vevo 2100, *Visual Sonics*, Toronto, Canadá), Figura 3.18. Além de apresentar os dados fisiológicos na tela, este sistema foi usado para monitorar o coração por meio de imagens em modo-B e modo-M. Imagens em modo-M foram adquiridas antes, logo após e 15 minutos após a estimulação ultrassônica. Foi feito pós-processamento da imagem, traçando-se quatro linhas sobre a imagem em modo-M, para cálculo de variáveis hemodinâmicas (BUIOCHI, 2011), Figura 3.19. Era possível estimar os volumes diastólico final (VDF) e sistólico final (VSF), cuja diferença corresponde ao volume ejetado (volume sistólico) (VS). Para isso, selecionavam-se as imagens do coração em diástole e sístole, das quais o contorno da cavidade do ventrículo esquerdo era extraído. A seguir, o volume do ventrículo esquerdo era estimado em cada fase. A fração de ejeção era calculada como a razão entre VS e VDF. O sistema de ultrassom continha uma plataforma acoplada (ver a seguir) em que era possível monitorar a frequência cardíaca, temperatura retal e frequência respiratória do rato.

c) plataforma aquecida (unidade avançada de acompanhamento fisiológico – *VEVO 2100 Imaging*

System) para manutenção da temperatura corpórea e posicionamento do rato. Esta plataforma continha quatro eletrodos para monitoramento do ECG e frequência respiratória, era utilizado um gel para o acoplamento das patas do animal aos eletrodos, as quais, depois de feito contato, eram fixadas à plataforma com fita adesiva. O sinal de ECG do animal era amplificado e disponibilizado para o sistema de imagem em dispositivo apropriado (nomeado pelo fabricante como caixa de controle – *control box*). Não havia informação disponível explicando como a frequência respiratória e a taxa respiratória eram obtidas e disponibilizadas para o usuário.

d) uma sonda retal conectada à unidade avançada de acompanhamento fisiológico (*VEVO 2100 Imaging System*).

e) uma unidade de leitura (modelo Samba 201, *Samba Sensors*, Suíça) e transdutor de pressão arterial (Samba Preclin 420LP, *Samba Sensors*, Suíça) conectados a um computador portátil (modelo *Inspiron Dell*, Round Rock, TX, EUA), foram utilizados para monitoramento da pressão arterial. O cateter utilizado é um microsensor de pressão de fibra óptica (Samba Preclin 420, *Samba Sensors*, Vastra Frolunda, Suécia).

f) termopar (sonda intratorácica) (modelo USB-TC01, *National Instruments*, Austin TX, EUA), conectado ao mesmo computador no qual era adquirido o sinal de pressão arterial, para monitoramento da temperatura intratorácica.

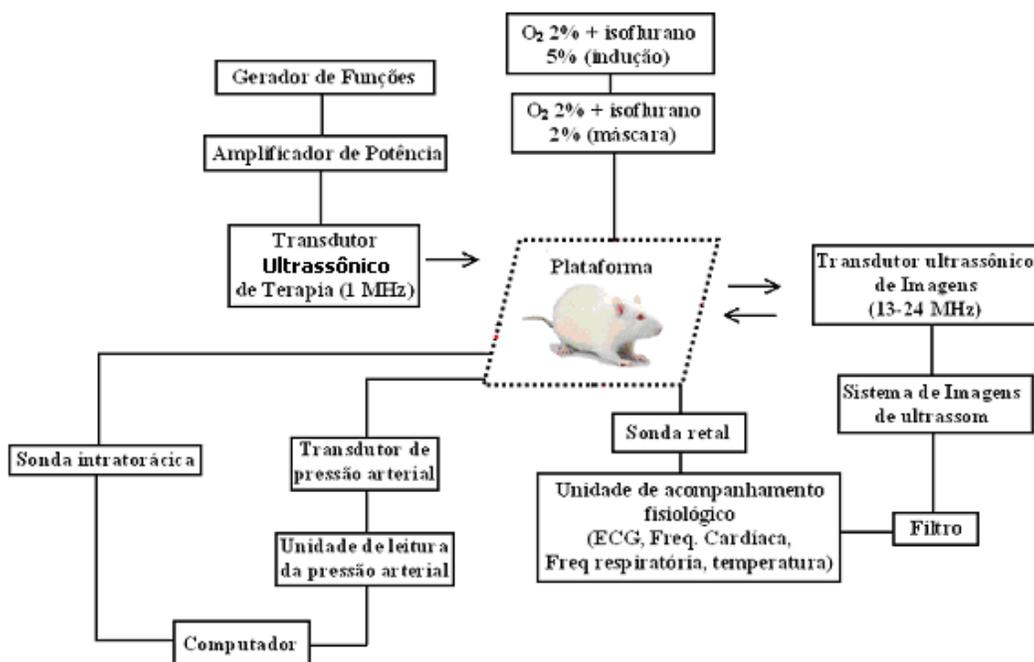


Figura 3.17: Diagrama de blocos do *setup* experimental utilizado para aplicação *in vivo* de ultrassom.

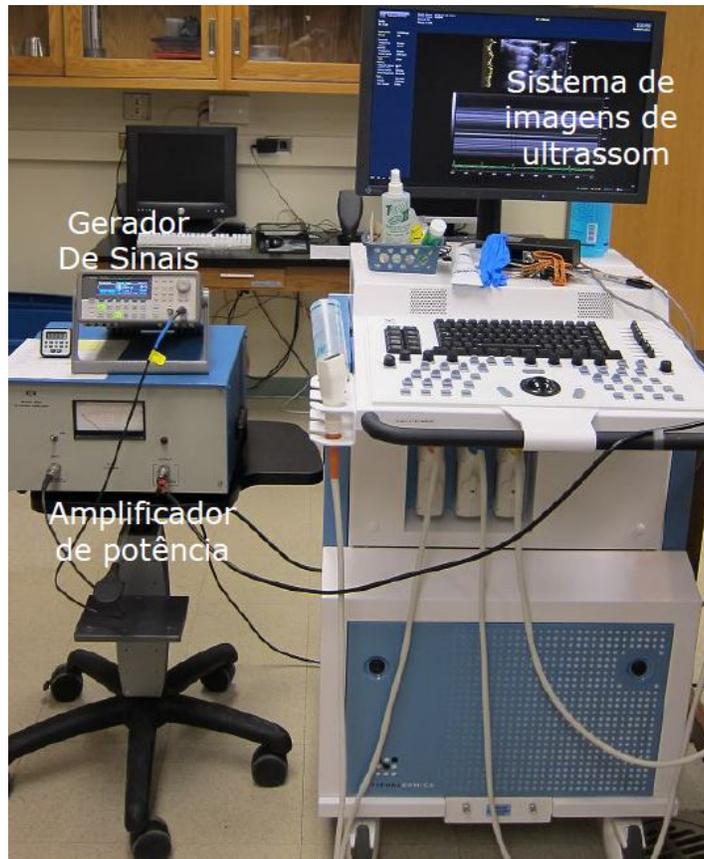


Figura 3.18: Gerador de sinais conectado ao amplificador de potência e sistema de imagens *Visual Sonics*.

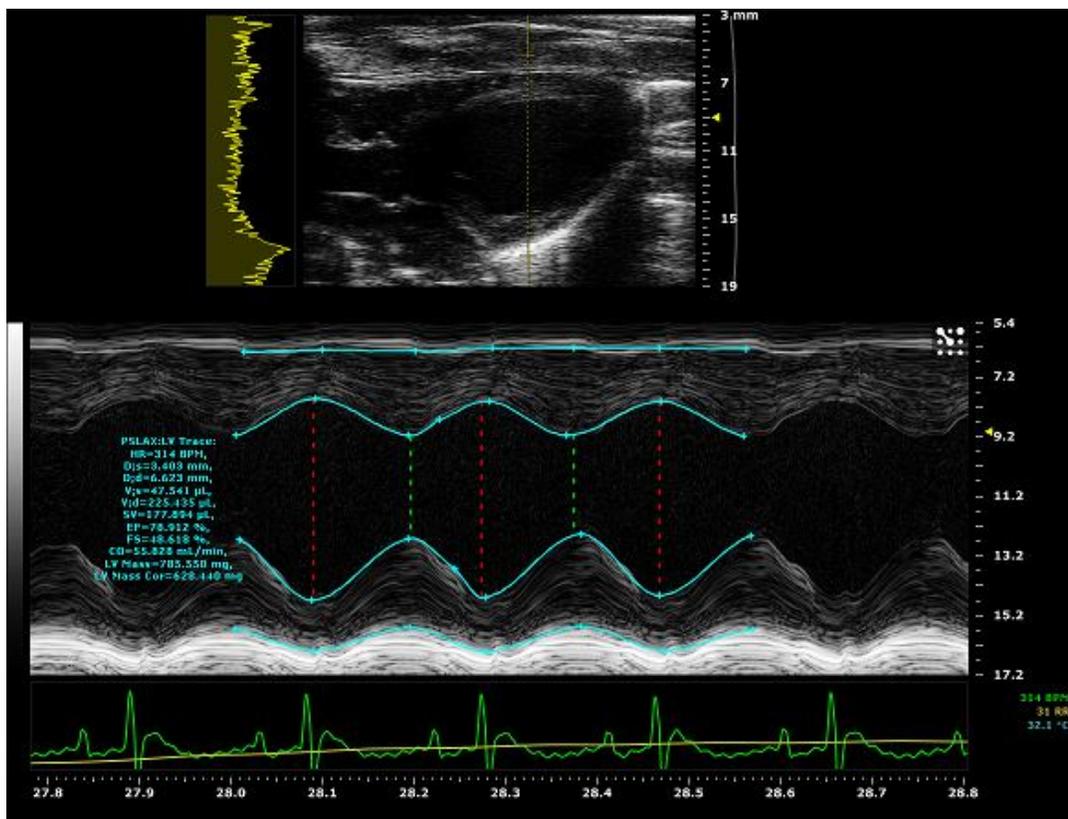


Figura 3.19: Tela do *Visual Sonics*: imagens em modo-B e modo-M com traçado para cálculo das variáveis fisiológicas.

3.3.3 ANIMAIS

As condições experimentais foram aprovadas pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da *University of Illinois*, Urbana-Champaign, EUA, (protocolo número 10104, ANEXO 2). Foram usados 20 ratos Sprague-Dawley (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, EUA), fêmeas, de aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram mantidos no biotério da *Division of Animal Resources, University of Illinois at Urbana-Champaign (DAR/UIUC)* em gaiolas plásticas individuais, com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*.

A indução da anestesia nos animais foi realizada com isoflurano 5%, utilizando-se uma câmara anestésica, e a seguir, foi administrado isoflurano 2% via máscara facial para a manutenção da anestesia. A pele sobre a região torácica foi raspada e tratada com creme depilatório para maximizar a transmissão acústica. Os ratos foram colocados em decúbito dorsal

sobre uma plataforma com temperatura controlada (32°C) para a estimulação por ultrassom. Monitoramento de temperatura corporal por meio de sonda retal e da frequência respiratória (equipamento Visual Sonics) e do sinal eletrocardiográfico (ECG) foi feito desde antes da exposição do coração ao ultrassom até 15 min após o seu término. A eutanásia foi realizada pela inalação de CO₂ por 5 minutos, sob anestesia. Os corações e pulmões foram removidos, fixados e processados para avaliação histológica.

Os animais utilizados nos experimentos *in vivo* compuseram 5 grupos, cada um composto de 5 animais: 1) preliminar; 2) controle; 3) ultrassom; 4) controle vagotomizado e 5) ultrassom vagotomizado. Em todos os grupos, os animais foram tratados como descrito no parágrafo anterior.

A) Grupo Preliminar: O grupo preliminar teve como objetivo a confirmação dos resultados obtidos por Buiochi (2011). Neste grupo, foi realizada a aplicação do ultrassom seguindo protocolo da Figura 3.20. A frequência de repetição de pulso (FRP) escolhida era baseada na frequência cardíaca (FC) do animal. Era aplicada uma FRP ligeiramente acima da FC, e nas seguintes, a FRP era decrementada em 1 Hz. Tanto a duração de aplicação do ultrassom, quanto à pausa para mudança da tensão aplicada, era de 30 s.

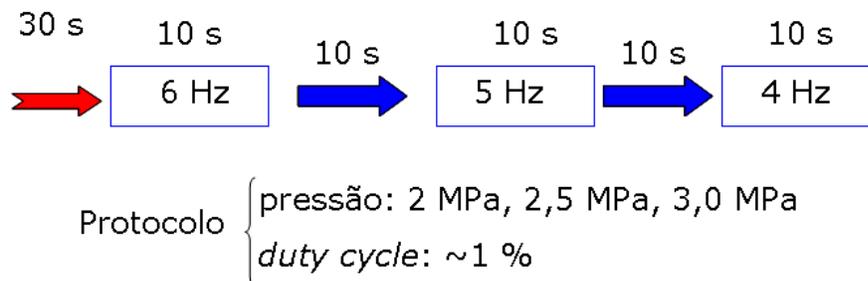


Figura 3.20: Protocolo ultrassônico dos experimentos *in vivo*.

B) Grupos Controle e Ultrassom: Todos os procedimentos foram semelhantes aos já descritos, exceto que, nestes grupos e nos descritos a seguir, foram realizadas, antes das demais medições: a) canulação da artéria carótida comum direita, para medição e monitoramento da pressão arterial; e b) inserção de um termopar entre os espaços intercostais para monitoramento da temperatura intratorácica do animal. No grupo controle, observaram-se os mesmos intervalos e protocolos de medição, porém não houve aplicação do ultrassom.

C) Grupos Vagotomizado Controle e Vagotomizado Ultrassom: Estes grupos foram semelhantes aos grupos descritos em (B), exceto pela realização de vagotomia cervical bilateral 15 min antes do início do experimento, período que foi permitido para estabilização da frequência cardíaca e da pressão arterial.

3.3.4 VAGOTOMIA BILATERAL

O animal foi pesado para cálculo da dose de fenilefrina, a ser administrada para teste da efetividade da cirurgia. O procedimento anestésico foi o mesmo já descrito. O animal foi depilado (pescoço e ombro). A temperatura corpórea do animal foi mantida com uma placa de aquecimento (36 °C) posicionada abaixo do corpo do animal.

Uma pequena incisão vertical em linha média foi feita 1 cm acima da região do esterno (a pele foi levantada com auxílio de uma pinça e cortada com uma tesoura). Foram utilizadas pinças de microdissecção para deslocar o músculo esterno mastóide esquerdo até a região da traquéia. O músculo foi afastado e pequenos retratores foram utilizados para expor o nervo vago esquerdo. O tecido conectivo que circunda o nervo vago foi afastado com cuidado, para separar o nervo da artéria carótida. O nervo vago foi isolado e suturado com linha de algodão 6-0 (que foi usada para manipular o nervo durante a cirurgia). O mesmo procedimento foi repetido do lado direito.

Nas primeiras vezes em que esta cirurgia foi realizada, sua efetividade foi testada por meio de injeção intravenosa do agonista de adrenoreceptores α fenilefrina. Este fármaco, agindo em adrenoreceptores α de arteríolas sistêmicas de resistência, leva ao aumento da pressão arterial, o que resulta em aumento da atividade dos barorreceptores arteriais. O reflexo desencadeado (reflexo baroreceptor) resulta em queda da frequência cardíaca, mediada por aumento de atividade das fibras parassimpáticas no nervo vago. Em estudos do reflexo baroreceptor, utilizam-se tipicamente 8-10

μg fenilefrina/kg de peso corporal, aplicados como *bolus* (VALENTI *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2011), ou $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, aplicados num volume de $0,1-0,05 \text{ ml}$, que é injetado dentro de 20 s (NASIMI & HATAM, 2011). Para este estudo, foi preparada uma solução estoque de fenilefrina ($6 \text{ mg}/\text{ml}$ de água), que foi mantida a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução de trabalho foi preparada diariamente, pela diluição da solução estoque 1:100 em solução salina. A solução de trabalho era mantida em recipiente com gelo até o momento da utilização. Utilizando uma seringa de 1 ml ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$, aplicados num volume de $0,05 \text{ ml}$) a solução era injetada na veia jugular do animal 15 min após a canulação da artéria carótida e estabilização do ritmo cardíaco. Para avaliação da eficácia da vagotomia, foi monitorada a frequência cardíaca por meio do ECG. Como não se observou efeito de bradicardia, concluiu-se que o procedimento para vagotomia era eficaz.

3.3.5 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA

A artéria carótida comum direita foi cateterizada, após procedimento de incisão cervical semelhante ao descrito para vagotomia. A artéria foi cuidadosamente separada dos nervos e laçada com linha 6-0 em 3 regiões (Figura 3.21 a). O primeiro e o terceiro nós foram bem amarrados para evitar que o sangue vazasse durante a inserção do cateter. O nó do meio permaneceu mais frouxo, pois o cateter é inserido entre o primeiro e segundo nós. Uma pequena incisão (ângulo de 45 graus) entre o primeiro e segundo nós foi feita com o auxílio de uma tesoura de microdissecção, e foram usadas pinças (com pontas protegidas com borracha para não danificar o transdutor de pressão) para posicionamento do cateter no interior da luz da artéria carótida (Figura 3.21 b). Foram feitos dois nós na segunda laçada para segurar o cateter e a terceira laçada foi removida (Figura 3.21 c). Depois desse procedimento, já foi possível observar as ondas de pressão arterial na tela do computador. Ao final do experimento, o cateter era retirado e imerso em uma solução de detergente para limpeza, antes de sua reutilização. Os demais materiais utilizados em todo o procedimento cirúrgico estão listados na seção APÊNDICE C.

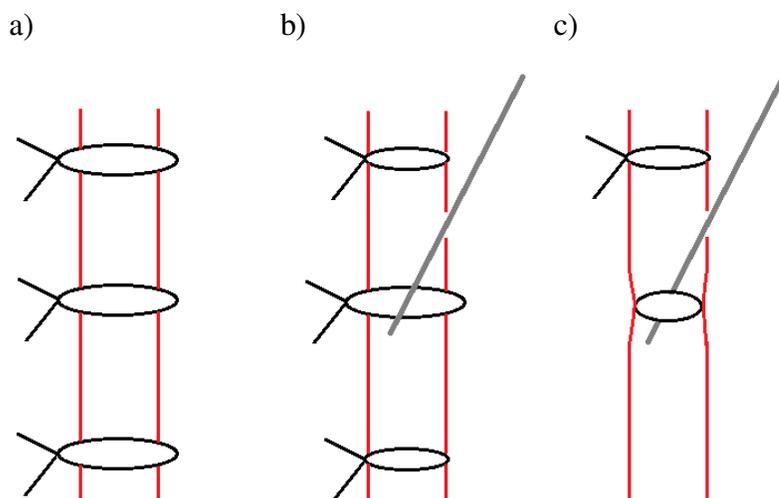


Figura 3.21: Suturas na artéria carótida para sua canulação: (a) três suturas, (b) inserção do cateter de pressão (linha oblíqua), (c) remoção da terceira sutura (ver texto para detalhes).

3.3.6 INSERÇÃO DO TERMOPAR

Com o auxílio de uma agulha para servir de guia, o termopar (modelo USB-TC01, *National Instruments*, Austin TX, EUA) foi posicionado entre os espaços das costelas (entre terceira e quarta) do lado esquerdo. Após a inserção, a agulha era retirada e a sonda fixada à superfície do tórax do animal com fita adesiva. Testes com a sonda foram realizados anteriormente ao experimento para observar se sua inserção não perfuraria o pulmão do rato, o que era verificado *a posteriori*, por análise histológica.

3.3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao final do experimento e após sacrifício do animal, o coração e pulmões eram retirados para posterior análise histológica. O coração era seccionado em fatias transversais de aproximadamente 1 mm de espessura. As fatias eram posicionadas em um cassete sempre na mesma orientação e imersas em uma solução de formaldeído (10%) que era trocada após 24 horas.

Separava-se o pulmão esquerdo (mais próximo da exposição do ultrassom) e, com o auxílio

de uma seringa, injetava-se através da traquéia a solução de formaldeído. O tecido permanecia no fixador pelo período mínimo de 24 horas. Após esse período, o tecido era seccionado (secções de aproximadamente 1,5 mm) transversalmente e posicionado no cassete, imerso na solução de formaldeído e enviado para análise. O tecido foi cortado em secções de 3 μ m de espessura e corado com hematoxilina-eosina. Após processamento do laboratório, as lâminas eram encaminhadas a uma patologista.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados estão apresentados como média acompanhada do erro-padrão da média ou intervalo de confiança para 95% (IC95%).

Os valores de frequência cardíaca e força desenvolvida antes, durante e depois da aplicação *in vitro* de ultrassom foram comparados por análise de variância monofatorial e teste de *rank* de Wilcoxon. Também foi utilizada análise de variância bifatorial para investigar a influência do *duty cycle*, para uma dada intensidade e FRP.

Para os dados dos experimentos *in vivo* foram aplicados teste t de *Student* ou análise de variância bifatorial para comparação entre os grupos que receberam estimulação ultrassônica e os respectivos controles.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado indicativo de significância estatística.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.1.1 EFEITO DA TEMPERATURA

Para a análise da variação da temperatura em função do tempo de aplicação do ultrassom, foi colocado um termopar (modelo U1251A, *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) no interior de um coração perfundido e repetiu-se o protocolo de aplicação do ultrassom de potência. Para efeitos de comparação utilizou-se a potência de 0,6-5,54 W em 1, 2 e 3 Hz e todos os *duty cycles* (Figura 4.1).

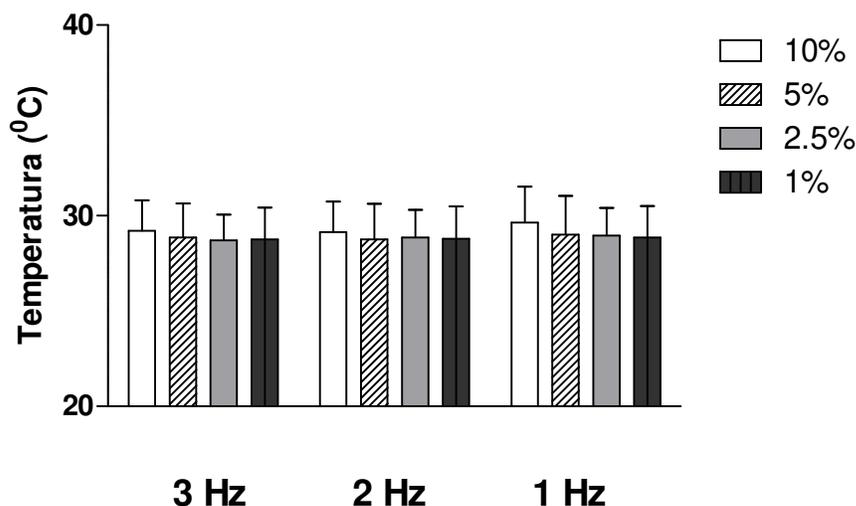


Figura 4.1: Gráfico com a variação da temperatura para diferentes *duty cycles* (1%, 2,5%, 5% e 10%).

O ultrassom funcionando em modo *burst* não causou aumento de temperatura dentro do coração perfundido, o que possibilita descartar efeitos térmicos que possam alterar a frequência cardíaca. Segundo Belassiano *et al.* (2011), danos térmicos foram encontrados no coração de ratos quando aplicado o ultrassom em modo contínuo.

4.1.2 EFEITOS DO ULTRASSOM SOBRE O CORAÇÃO PERFUNDIDO DE RATO

Os valores iniciais e 15 min após a aplicação do ultrassom para as variáveis fisiológicas encontram-se nas Tabelas 4.1 e 4.2

Tabela 4.1: Valores iniciais para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o coração perfundido antes da aplicação do protocolo ultrassônico.

Variáveis	MÉDIA ± EP			
	1% <i>duty cycle</i>	2,5% <i>duty cycle</i>	5% <i>duty cycle</i>	10% <i>duty cycle</i>
Frequência Espontânea	210,00±26,00	162±26,60	184,00±21,40	170,00±16,53
Força desenvolvida	2,20±0,25	1,80±0,27	1,60±0,34	1,50±0,30
Arritmias	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Tabela 4.2: Valores 15 min após a aplicação do protocolo ultrassônico para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o coração perfundido.

Variáveis	MÉDIA ± EP			
	1% <i>duty cycle</i>	2,5% <i>duty cycle</i>	5% <i>duty cycle</i>	10% <i>duty cycle</i>
Frequência Espontânea	175,00±23,30	183,00±23,20	167,00±21,00	167,00±18,30
Força desenvolvida	1,90±0,22	1,70±0,26	1,60±0,33	1,40±0,30
Arritmias	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

A Figura 4.2 mostra um traçado de força desenvolvida pelo coração isolado que mostra a resposta tipicamente observada após a aplicação de ultrassom: redução da frequência espontânea, sem alteração marcante da força desenvolvida.

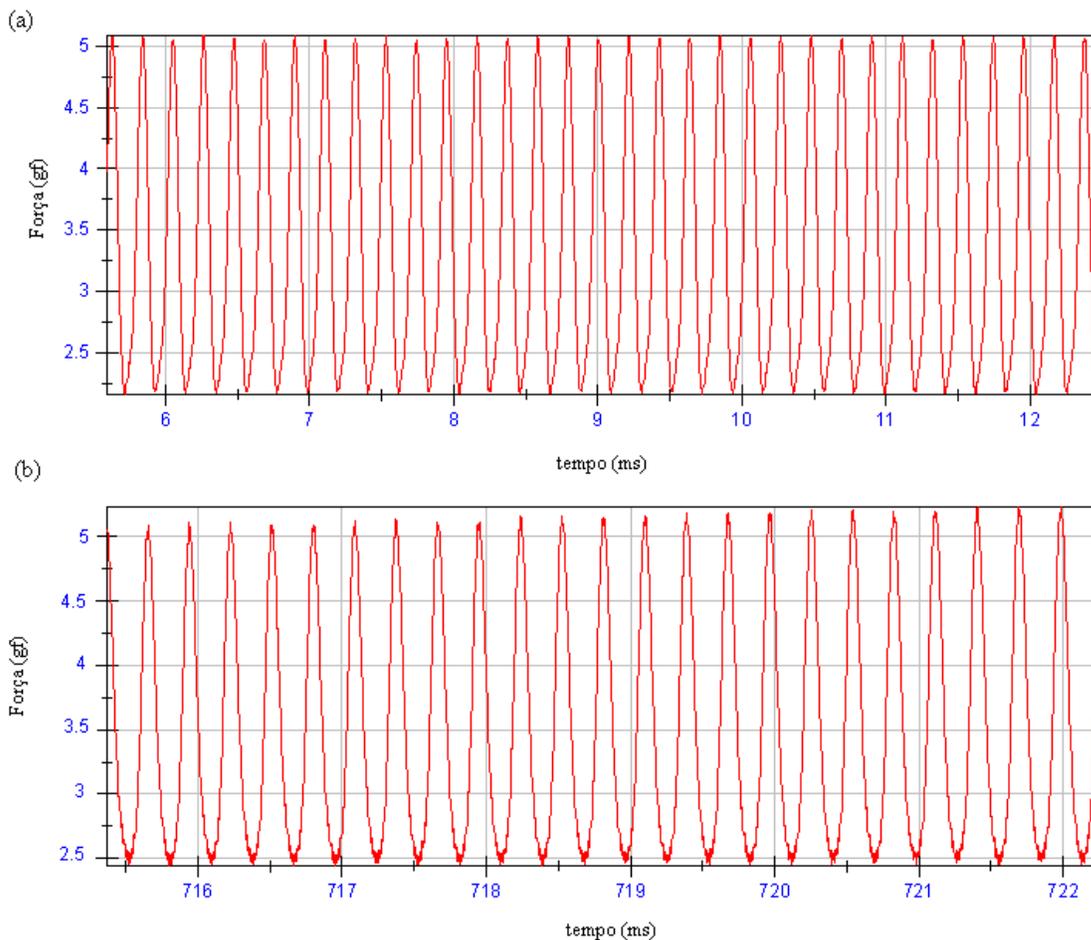


Figura 4.2: Traçado de força desenvolvida por um coração perfundido de rato, estimulado com ultrassom, com o protocolo A (pág. 23). Os registros foram feitos antes (a: frequência espontânea de 277 bpm e força desenvolvida de 2,6 gf) e durante (b: frequência: 210 bpm e força desenvolvida de 2,5 gf) a aplicação de ultrassom.

Para a análise estatística, foram considerados os valores antes, durante ou após a aplicação do ultrassom. Para efeito de comparação, foi utilizado o valor de potência de 0,6-5,54 W . A variação de valor de frequência ou força foi expressa em porcentagem do valor registrado antes da estimulação. Como mostrado na Figura 4.3, a FC e a força não foram afetados pelo *duty cycle* ($p > 0,05$; análise de variância monofatorial). Porém, para qualquer *duty cycle*, a variação da FC foi estatisticamente diferente de zero ($p < 0,05$; teste de *Wilcoxon*), o que indica efeito cronotrópico negativo significativo. O teste de *Wilcoxon* não acusou variação de força desenvolvida após aplicação do ultrassom que fosse diferente de zero ($P > 0,05$).

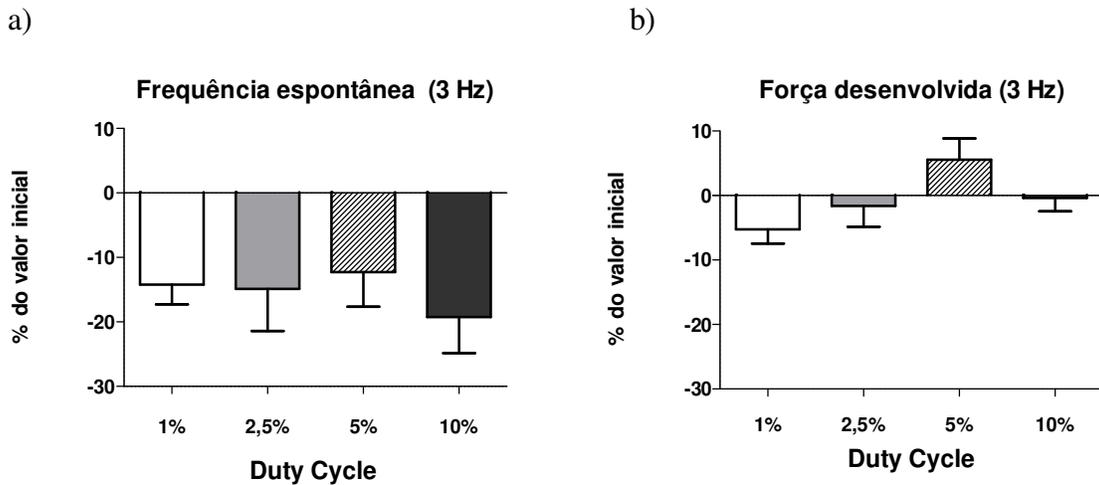


Figura 4.3: Valores em % do valor inicial em função do *duty cycle* durante a aplicação do protocolo ultrassônico (a) Frequência espontânea (b) Tensão (força) desenvolvida.

A figura 4.4 mostra valores de FC antes e após o término da estimulação ultrassônica. Além da ausência de influência significativa do *duty cycle*, não se detectou diferença significativa entre os valores antes e depois da estimulação ($p > 0,05$; análise de variância bifatorial). Isto indica que o efeito cronotrópico negativo é transitório, ou seja, cessa após a aplicação do ultrassom e ausência de efeito inotrópico.

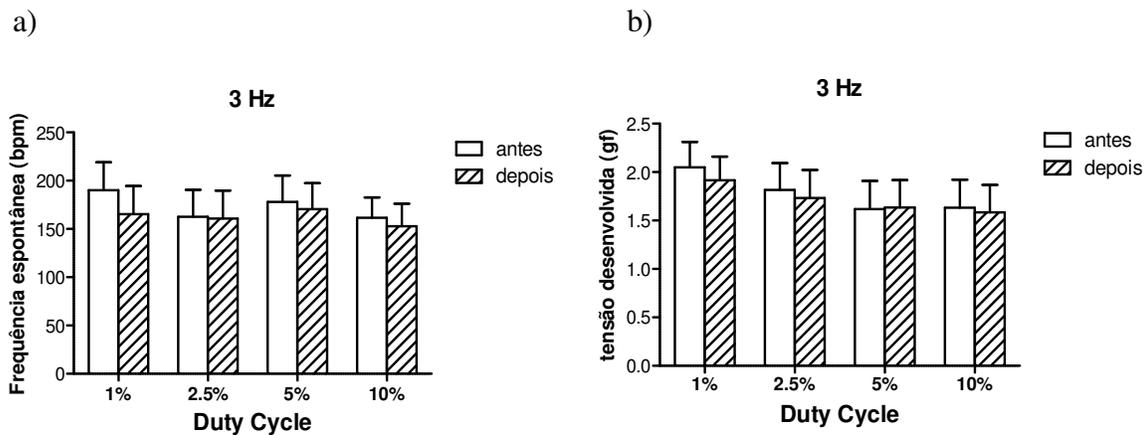


Figura 4.4: Valores de: a) FC antes e após o término da estimulação ultrassônica; b) tensão (força de contração) desenvolvida antes e após o término da estimulação ultrassônica.

Considera-se que cavitação acústica pode induzir, localmente, microlesões no miocárdio, e isso teria ação estimulante e arritmogênica (ZAKHAROV *et al.*, 1991). A presença de arritmias foi observada durante a aplicação do ultrassom de alta potência. Porém, assim como ocorrido com a

FC, a ocorrência e frequência de arritmias foi independente do *duty cycle* utilizado, embora seja aparente uma tendência de aumento da atividade arritmica com o aumento do *duty cycle* (Figura 4.5) e seu efeito foi transitório, ou seja, restrito ao período de aplicação do ultrassom.

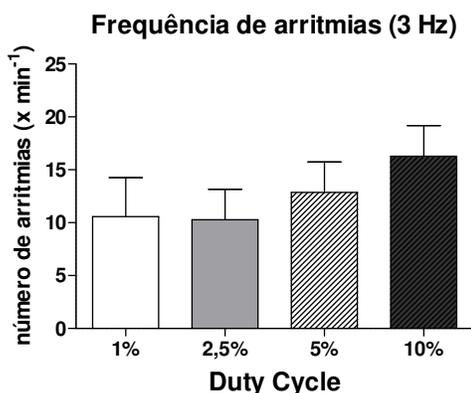


Figura 4. 5: Frequência de arritmias em relação ao *duty cycle*.

4.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.2.1 EFEITO DA TEMPERATURA

Medições de temperatura foram realizadas em um tanque a 22,2 °C contendo água destilada degaseificada. O termopar (modelo NI USB-TC01, *National Instruments*, Austin, TX, EUA) foi posicionado a 1 cm (simulação da distância do transdutor ao coração) afastado da face do transdutor. O termopar foi conectado a um dispositivo de medição (*National Instruments*, Austin, TX, EU) para aquisição contínua. Foi utilizado o mesmo protocolo ultrassônico utilizado nos experimentos cardíacos. Observou-se durante a execução do protocolo de estimulação uma variação de 0,4 °C (Figura 4.6).

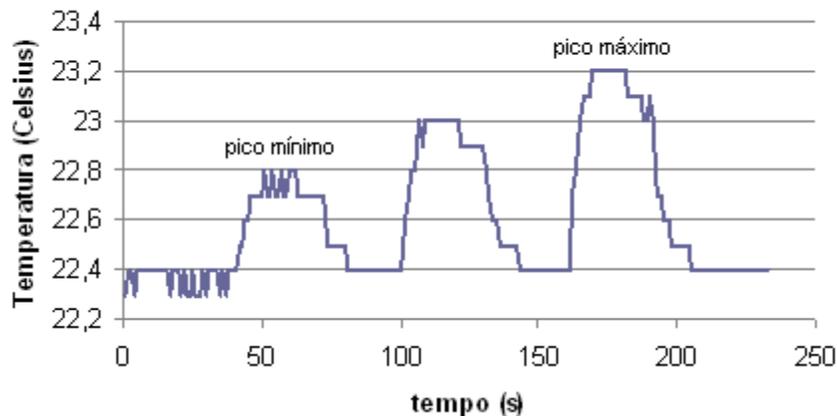


Figura 4.6: Variação de temperatura durante a aplicação do ultrassom entre pico mínimo (2 MPa) e máximo (3 MPa). Nota-se variação de 0,4°C entre pico mínimo e máximo.

4.2.2 EFEITO DO ULTRASSOM SOBRE AS VARIÁVEIS MEDIDAS *IN VIVO*

Em estudo *in vivo* (BUIOCHI, 2011), foi observado que a aplicação do ultrassom de 1 MHz em coração de ratos causava efeito cronotrópico negativo, sem maiores impactos hemodinâmicos. O grupo preliminar do presente trabalho teve por objetivo confirmar esses resultados. Os valores iniciais para as variáveis fisiológicas do grupo preliminar encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o grupo preliminar antes, logo após e 15 min após a aplicação do protocolo ultrassônico (* indica variáveis que tiveram alteração significativa).

Preliminar (n=5)				
		<i>Antes</i>	<i>Logo após</i>	<i>15 min após</i>
VARIÁVEIS	UNIDADE	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP
Frequência cardíaca *	bpm	322,80 ± 13,50	299,40 ± 13,94	282,4,00 ± 11,84
Débito cardíaco *	mL/min	59,42 ± 4,40	50,04 ± 4,52	47,83 ± 3,18
Volume ejetado	μL	182,85 ± 8,48	166,58 ± 11,04	169,33 ± 9,63
Fração de ejeção	%	79,45 ± 1,74	78,10 ± 1,54	79,37 ± 1,85
Encurtamento	%	49,42 ± 1,84	47,88 ± 1,51	49,24 ± 1,80
Volume diastólico final	μL	230,45 ± 11,00	214,04 ± 15,79	215,09 ± 16,50
Volume sistólico final	μL	47,65 ± 5,27	47,47 ± 5,84	45,74 ± 7,19
Frequência respiratória	l/min	34,80 ± 1,58	31,20 ± 0,44	29,80 ± 0,66
Temperatura retal	°C	34,46 ± 0,40	32,66 ± 0,35	32,20 ± 0,32

Teste t de *Student* para amostras pareadas foi utilizado para comparar os valores das variáveis medidas antes e logo após a aplicação do ultrassom de alta potência. A aplicação do ultrassom causou efeito cronotrópico negativo (redução de ~ 7%) da frequência cardíaca basal logo após a aplicação do ultrassom ($p < 0,05$; Figura 4.7 a)), o débito cardíaco diminuiu ~16% logo após a aplicação do ultrassom ($p < 0,05$; Figura 4.7 b)). Na figura 4.8 observa-se o traçado de ECG para cálculo da frequência cardíaca, antes, logo após e 15 min após a aplicação do ultrassom.

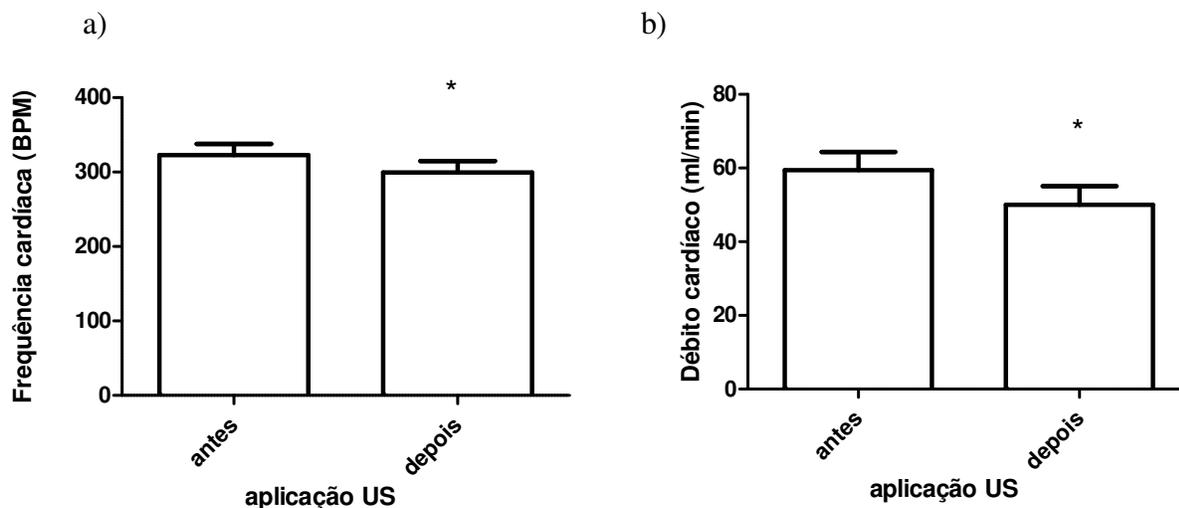


Figura 4.7: Efeito para a frequência cardíaca (esquerda) e débito cardíaco (direita) antes e logo após a aplicação do US. (* indica variáveis que tiveram alteração significativa)

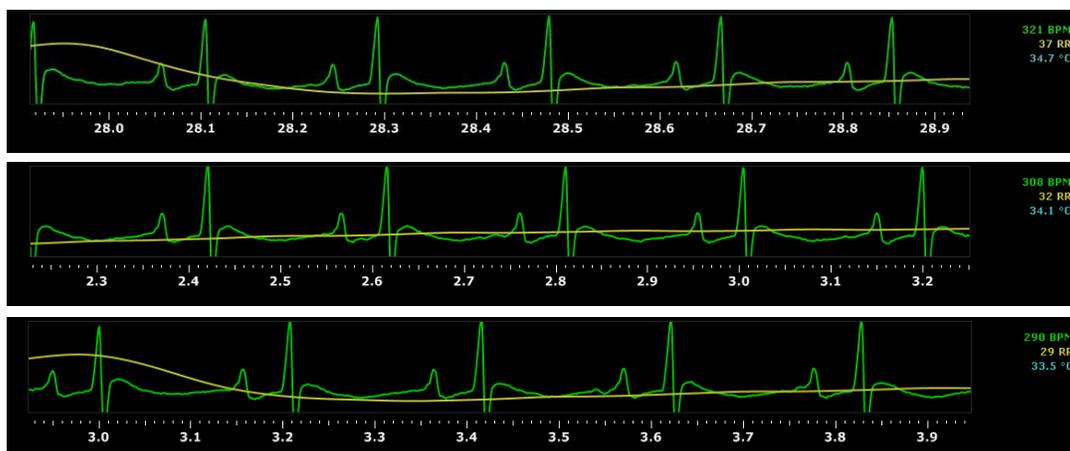


Figura 4.8: Traçado do ECG antes, logo após e 15 min após a aplicação do ultrassom para os experimentos preliminares.

A seguir, foram comparados animais submetidos ou não (grupos controle) à estimulação ultrassônica, nos quais a artéria carótida foi canulada para medição da pressão arterial. Foi também medida a temperatura intratorácica. Os valores iniciais e os valores após a aplicação de ultrassom (ou período correspondente no grupo controle) para as variáveis fisiológicas do grupo ultrassom e controle encontram-se na Tabela 4.4.

Foi realizado teste t de *Student* para amostras não pareadas comparando os valores do grupo controle e ultrassom e não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos nos valores iniciais.

Tabela 4.4: Valores iniciais, logo após e 15 min após para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o grupo controle e ultrassom antes da aplicação do protocolo ultrassônico (* indica variáveis que tiveram alteração significativa).

VARIÁVEIS	Controle (n=5)			Ultrassom (n=5)		
	<i>Antes</i>	<i>Logo após</i>	<i>15 min após</i>	<i>Antes</i>	<i>Logo após</i>	<i>15 min após</i>
	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP
Frequência cardíaca (bpm)*	288,80±10,54	276,00±9,50	270,40 ± 9,20	308,80 ± 13,24	302,80±11,90	297,00±9,13
Débito cardíaco (mL/min)	52,74 ± 3,14	47,64 ± 2,70	49,06 ± 2,54	53,52±3,00	51,88 ± 1,25	53,82 ± 1,18
Volume ejetado (µL)	182,62±9,40	173,44±11,17	182,36 ± 9,14	174,36 ± 12,08	172,40 ± 5,78	181,80 ± 6,00
Fração de ejeção (%)	78,46 ± 3,95	80,48 ± 4,08	82,18 ± 4,00	85,92 ± 1,00	85,78 ± 2,50	89,44 ± 2,00
Encurtamento (%)	49,50 ± 4,51	51,74 ± 4,78	53,56 ± 4,59	56,48±1,17	56,90 ± 3,03	62,02 ± 3,05
Volume diastólico final (µL)*	233,10 ± 6,90	217,00±14,51	223,40±11,70	203,84±16,40	201,58 ± 7,72	203,60 ± 6,87
Volume sistólico final (µL)	50,43 ± 8,92	43,56 ± 10,75	41,04 ± 10,56	29,47 ± 4,40	29,22 ± 5,65	21,70 ± 4,47
Frequência respiratória (/min)*	29,20 ± 0,33	25,60 ± 0,22	21,40 ± 2,00	28,80 ± 1,75	27,20 ± 1,66	24,60 ± 1,22
Temperatura intratorácica (°C)*	31,64 ± 0,22	31,54 ± 0,15	31,32 ± 0,14	32,42 ± 0,21	32,14 ± 0,20	31,84 ± 0,17
Temperatura retal (°C)	33,92 ± 0,23	33,00 ± 0,12	32,56 ± 0,08	33,68 ± 0,24	33,30 ± 0,29	32,74 ± 0,20
Pressão Arterial (mmHg)*	88,60 ± 3,15	84,80 ± 4,74	85,20 ± 5,15	96,60 ± 2,73	96,00 ± 2,72	94,60 ± 3,00

Com o intuito de se esclarecer se o aumento do tônus vagal está envolvido na resposta cronotrópica negativa, foram repetidos os experimentos em animais cuja artéria carótida havia sido canulada, porém, nesses grupos também foi realizada vagotomia cervical bilateral.

Os valores iniciais, logo após e 15 min após das variáveis fisiológicas encontram-se na Tabela 4.5, os valores iniciais foram medidos antes e após a vagotomia bilateral e canulação da artéria carótida, mas para fins de análise estatística foram utilizados como valores iniciais os valores pós

cirurgia e estabilização.

Tabela 4.5: Valores iniciais, logo após e 15 min após para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o grupo ultrassom vagotomizado e controle vagotomizado antes da aplicação do protocolo ultrassônico (* indica variáveis que tiveram alteração significativa).

VARIÁVEIS	Controle vagotomizado (n=5)			Ultrassom vagotomizado (n=5)		
	<i>Antes</i>	<i>Logo após</i>	<i>15 min após</i>	<i>Antes</i>	<i>Logo após</i>	<i>15 min após</i>
	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP	MÉDIA ± EP
Frequência cardíaca (bpm) *	317,60± 8,10	304,60 ± 8,09	299,20 ± 8,95	287,80± 9,22	282,80 ± 7,22	276,60 ± 9,05
Débito cardíaco (mL/min)	53,66 ± 6,60	40,46 ± 1,74	47,28 ± 3,06	52,28 ± 1,58	56,48 ± 1,58	54,28 ± 1,89
Volume ejetado (µL)*	154,14± 10,65	146,32 ± 6,01	158,62 ± 11,34	182,10± 7,87	200,74 ± 10,1	196,92 ± 11,35
Fração de ejeção (%)*	82,12 ± 3,33	82,32 ± 3,68	81,84 ± 2,86	84,78 ± 2,00	87,64 ± 1,10	89,68 ± 1,63
Encurtamento (%)	52,88 ± 3,92	53,16 ± 4,16	52,28 ± 3,42	55,41 ± 2,34	58,91 ± 1,41	62,09 ± 2,30
Volume diastólico final (µL)	190,00± 16,84	179,52 ± 10,34	195,82 ± 16,77	216,01± 13,27	229,80 ± 13,47	220,90 ± 16,43
Volume sistólico final (µL)	35,86 ± 8,56	33,22 ± 8,00	37,20 ± 7,04	33,90 ± 6,40	28,96 ± 3,94	24,00 ± 5,39
Frequência respiratória (/min) *	29,40 ± 1,18	26,60 ± 1,84	25,80 ± 1,96	26,80 ± 1,24	25,80 ± 0,95	22,20 ± 2,2
Temperatura intratorácica (°C) *	32,40 ± 0,25	31,48 ± 0,18	31,16 ± 0,19	31,84 ± 0,36	31,24 ± 0,32	30,74 ± 0,28
Temperatura retal (°C) *	34,00± 0,2	32,92 ± 0,21	32,56 ± 0,22	33,66 ± 0,39	32,90 ± 0,36	32,20 ± 0,35
Pressão Arterial (mmHg) *	101,0 ± 7,2	106,20 ± 7,32	105,40 ± 7,21	93,20 ± 3,29	89,80 ± 2,83	84,80 ± 4,00

Foi realizado teste t de *Student* para amostras não pareadas comparando os grupos controle vagotomizado e ultrassom vagotomizado e não houve diferença significativa (P>0,05) entre os grupos nos valores iniciais.

Foi realizada análise de variância bifatorial comparando os grupos (ultrassom vs ultrassom

controle, ultrassom vagotomizado vs controle vagotomizado) e ponto no tempo (antes, logo após e 15 min após a aplicação do US). (Tabelas 4.6, 4.7)

A) Grupos Controle vs Ultrassom

Na comparação dos grupos ultrassom vs controle foi detectada diferença significativa para frequência cardíaca, pressão arterial e volume diastólico final, que foram maiores nos controles. Porém, não houve diferença dependente do tempo ou interação significativa entre grupo e tempo, Tabela 4.6. Tal interação seria esperada no caso de diferentes comportamentos de alguma variável nos diferentes grupos, ao longo do tratamento experimental. No entanto, como observado na Figura 4.9, isto não ocorreu, o que indica ausência de efeitos significativos do ultrassom sobre as variáveis citadas acima.

Tabela 4.6: Resultado da análise de variância bifatorial (graus de liberdade (GL), valores de F de Fisher e de P) para o efeito do ultrassom para as variáveis frequência cardíaca, volume diastólico final e pressão arterial para os grupos ultrassom e controle ultrassom.

	Frequência Cardíaca			Volume Diastólico Final			Pressão Arterial		
	GL	F	P	GL	F	P	GL	F	P
Grupo (G)	1	8,411	0,013	1	5,270	0,041	1	5,340	0,039
Tempo (T)	2	0,650	0,540	2	0,223	0,804	2	0,380	0,692
Interação (GxT)	2	0,0701	0,933	2	0,190	0,829	2	0,054	0,951

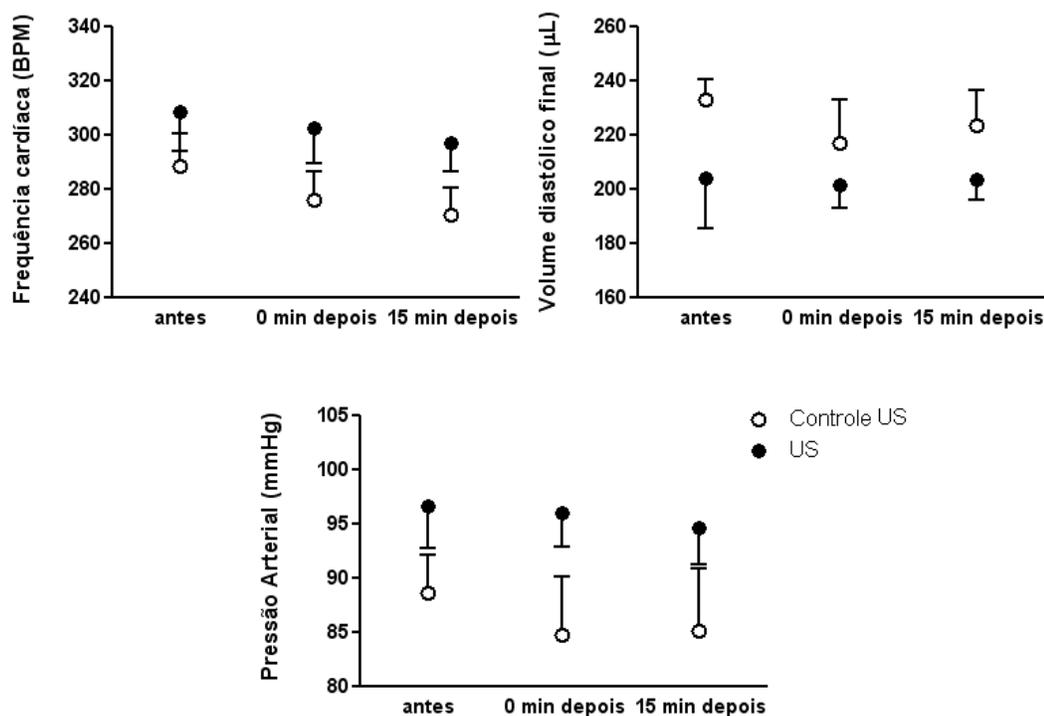


Figura 4.9: Médias dos valores absolutos de frequência cardíaca, volume diastólico final e pressão arterial em função do tempo (antes, logo após e 15 min após a aplicação do US) para os grupos controle ultrassom e ultrassom.

Para as variáveis frequência respiratória, temperatura retal e temperatura intratorácica, houve uma queda significativa com o tempo, porém não houve diferença significativa entre os grupos, Tabela 4.7. A Figura 4.10 ilustra as variáveis medidas em valores absolutos em função do tempo.

Tabela 4.7: Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom para as variáveis frequência respiratória, temperatura retal e temperatura intratorácica para os grupos controle ultrassom e ultrassom.

	Frequência Respiratória			Temperatura Retal			Temperatura Intratorácica		
	GL	F	P	GL	F	P	GL	F	P
Grupo (G)	1	1,438	0,254	1	0,194	0,668	1	2,216	0,162
Tempo (T)	2	7,176	0,009	2	12,200	0,001	2	19,861	0,000
Interação (GxT)	2	0,725	0,504	2	0,812	0,467	2	0,874	0,442

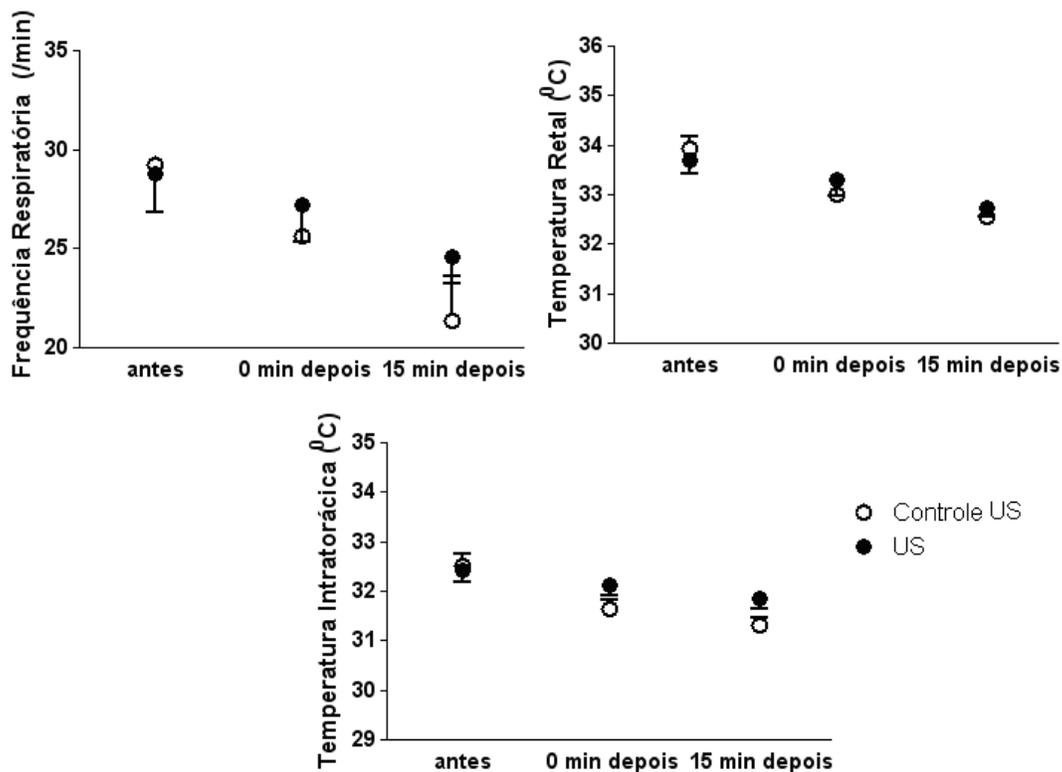


Figura 4.10: Médias dos valores absolutos de frequência respiratória, temperatura retal e temperatura intratorácica em função do tempo (antes, logo após e 15 min após a aplicação do US) para os grupos controle ultrassom e ultrassom.

B) Grupos Vagotomizado Controle vs Vagotomizado Ultrassom

Na comparação dos grupos ultrassom vagotomizado vs controle vagotomizado, detectou-se diferença significativa entre os grupos para frequência cardíaca, volume ejetado, fração de ejeção, pressão arterial e volume diastólico final. Porém, o tempo não teve influência significativa. Mais uma vez, não se observou significância estatística para a interação grupo x tempo. A Tabela 4.8 ilustra os valores absolutos das variáveis em função do tempo. A Figura 4.11 ilustra as variáveis medidas em valores absolutos em função do tempo.

Tabela 4.8: Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom para as variáveis frequência cardíaca, volume diastólico final, volume ejetado, fração de ejeção e pressão arterial para os grupos controle vagotomizado e ultrassom vagotomizado, com graus de liberdade (GL) G =1, T = 2 e GxT = 2.

	Frequência Cardíaca		Volume Diastólico Final		Volume Ejetado		Fração de Ejeção		Pressão Arterial	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Grupo (G)	10,510	0,007	12,430	0,004	259,2	<0,0001	86,52	<0,0001	13,27	0,003
Tempo (T)	1,206	0,333	0,037	0,964	0,207	0,816	0,595	0,567	0,274	0,765
Interação (GxT)	0,111	0,896	0,741	0,497	0,534	0,600	0,245	0,787	0,171	0,845

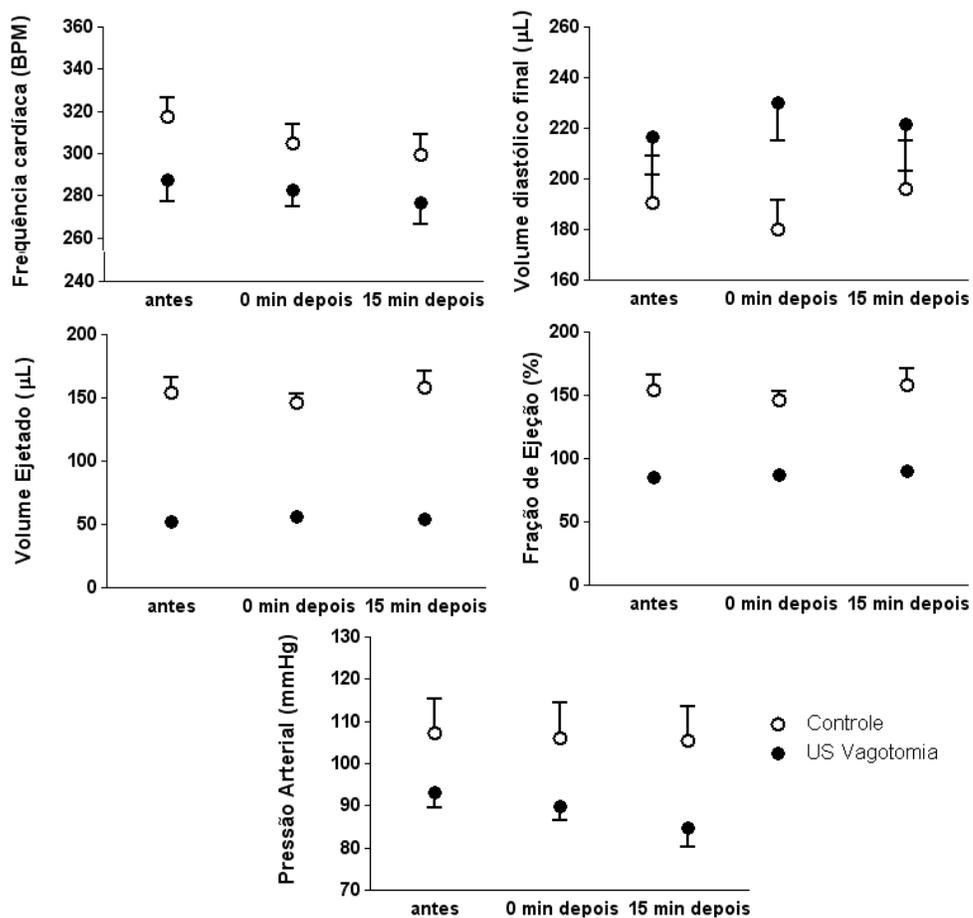


Figura 4.11: Gráfico dos valores absolutos em função do tempo (antes, logo após e 15 min após a aplicação do US) para as variáveis frequência respiratória, temperatura retal e temperatura intratorácica para os grupos controle ultrassom vagotomizado e ultrassom vagotomizado.

Como observado nos grupos com os nervos vagos intactos, houve uma queda significativa das temperaturas retal e intratorácica com o tempo, porém não houve diferença significativa entre os grupos, Tabela 4.9. A Figura 4.12 ilustra as variáveis medidas em valores absolutos em função do tempo.

Tabela 4.9: Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom vagotomizado para as variáveis temperatura retal e temperatura intratorácica controle ultrassom vagotomizado e ultrassom vagotomizado, com graus de liberdade (GL) G =1, T = 2 e GxT = 2.

	Temperatura Retal		Temperatura Intratorácica	
	F	P	F	P
Grupo (G)	0,873	0,369	2,134	0,170
Tempo (T)	5,168	0,024	9,745	0,003
Interação (GxT)	0,320	0,732	0,111	0,896

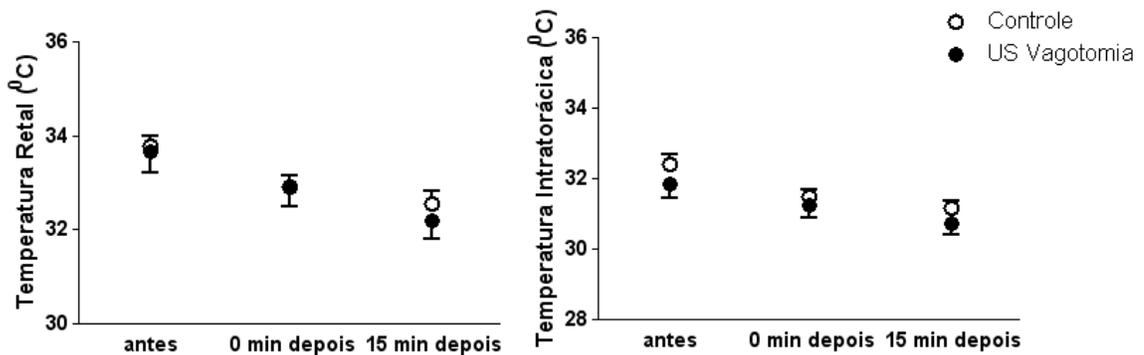


Figura 4.12: Gráfico dos valores absolutos em função do tempo (antes, logo após e 15 min após a aplicação do US) para as variáveis temperatura retal e temperatura intratorácica controle ultrassom vagotomizado e ultrassom vagotomizado.

As Figuras 4.13 (grupo US) e 4.14 (grupo US vagotomizado) ilustram o registro de pressão arterial antes, durante e após a aplicação do ultrassom. Durante a aplicação do ultrassom (painéis (b), observa-se que o sinal se tornou mais ruidoso, o que dificulta a definição de possíveis contrações cardíacas arrítmicas).

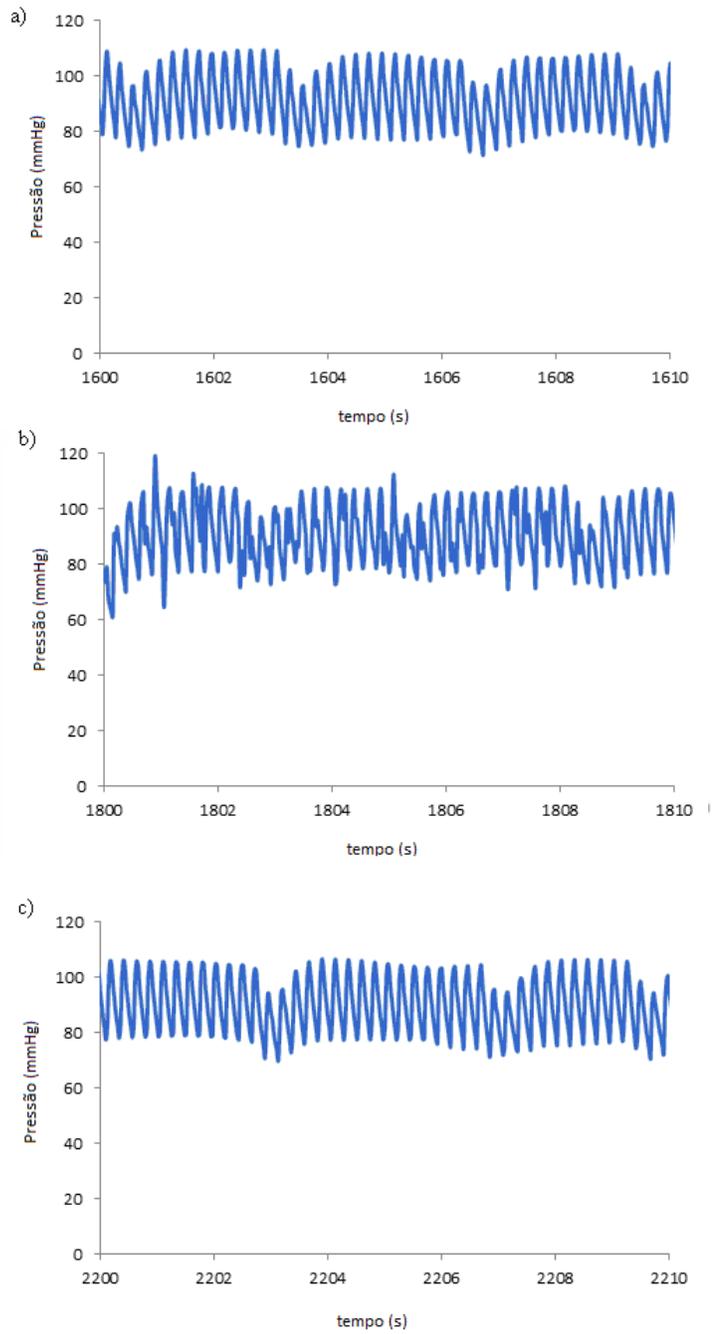


Figura 4.13: Registro da pressão arterial em função do tempo para o grupo ultrassom a) antes da aplicação do protocolo ultra-sônico, b) durante 10 s de aplicação do ultrassom, c) após a aplicação do ultrassom.

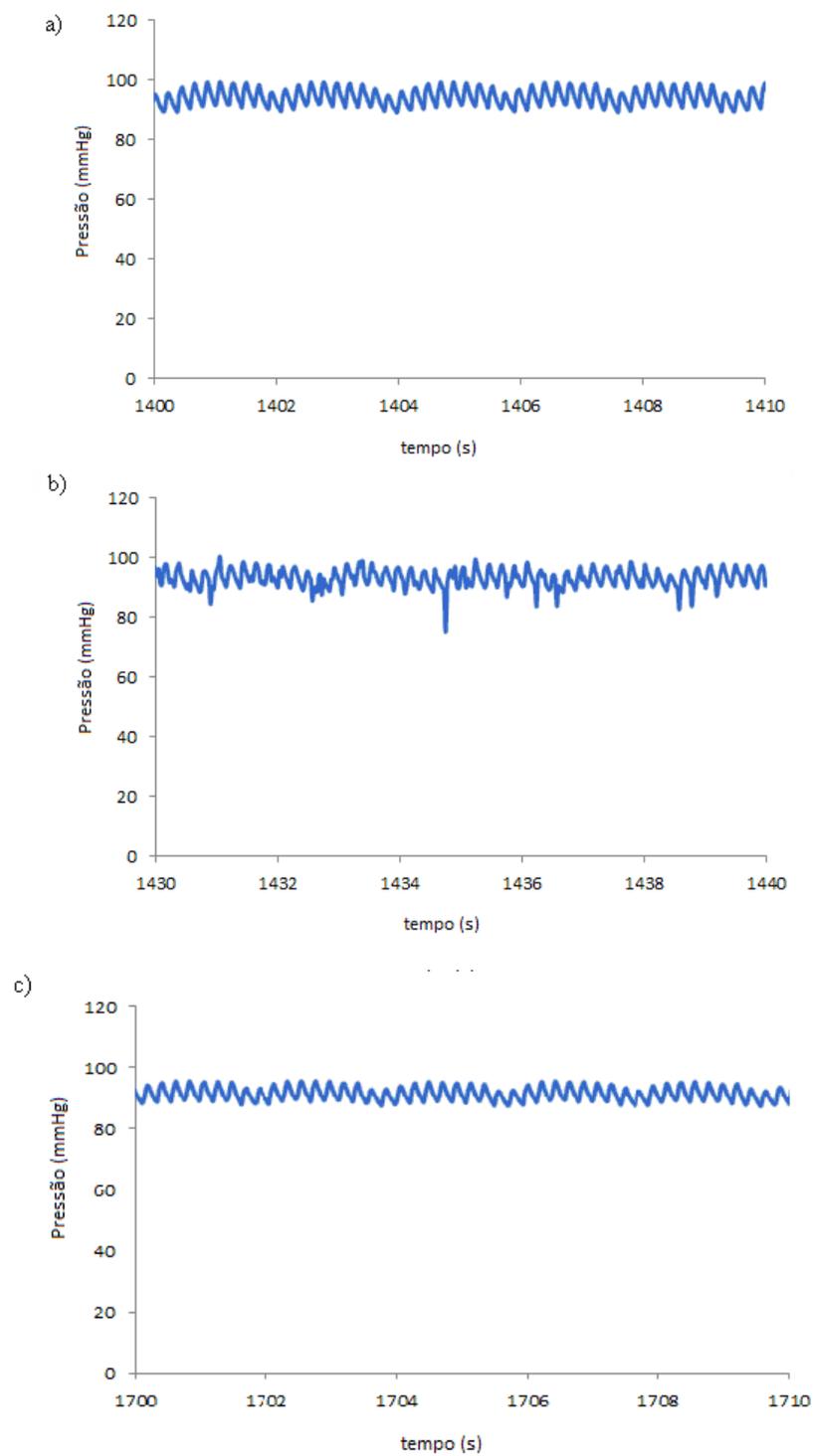


Figura 4.14: Registro da pressão arterial em função do tempo para o grupo ultrassom vagotomizado a) antes da aplicação do protocolo ultra-sônico, b) durante 10 s de aplicação do ultrassom, c) após a aplicação do ultrassom.

4.2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

O exame histológico do coração e dos pulmões dos animais de todos os grupos expostos à estimulação ultrassônica não revelou a indução de lesões após o tratamento com ultrassom.

Foi realizada também a análise histológica para os grupos controle ultrassom (CTR- US), ultrassom (US) e grupos controle vagotomizado (CTR-VG), ultrassom vagotomizado (US-VG). A Figura 4.15 e Figura 4.16 ilustram cortes histológicos dos pulmões e coração, respectivamente, imagens à direita grupos controle e imagens à esquerda grupos que foram expostos à estimulação ultrassônica de 1 MHz.

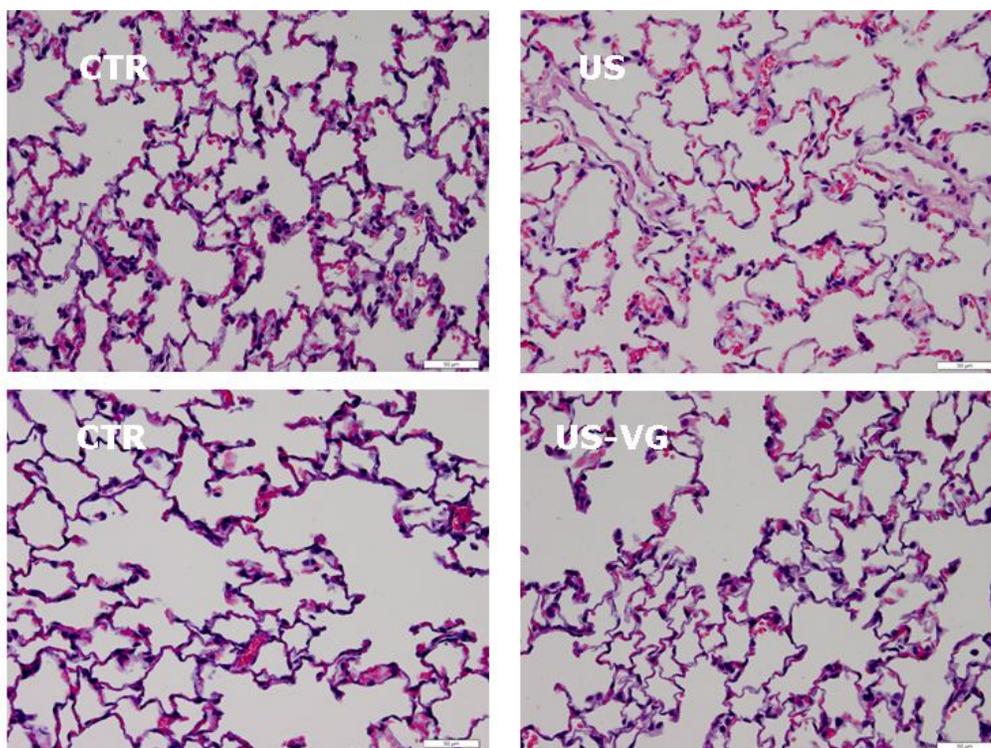


Figura 4.15: Secções histológicas do pulmão (magnificação 40x, escala de 50 µm; coloração hematoxilina-eosina) do grupo controle (esquerda) e grupos que foram expostos ao ultrassom (direita).

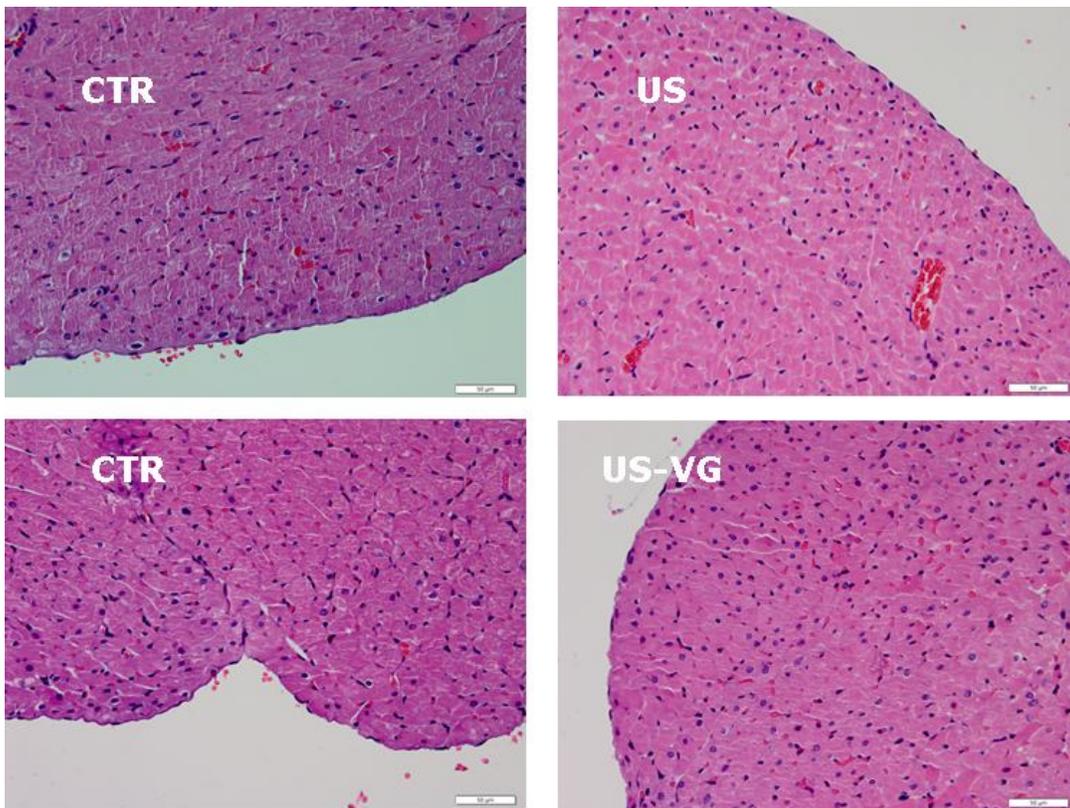


Figura 4.16: Secções histológicas do coração (magnificação 40x, escala de 50 μm ; coloração hematoxilina-eosina), do grupo controle (esquerda) e grupos que foram expostos ao ultrassom (direita).

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

Embora a interação do ultrassom de potência (70 kHz - 2,3 MHz) com o tecido cardíaco tenha sido estudada anteriormente, nenhum estudo mostra a comparação da aplicação do ultrassom de potência em estudos *in vitro* e *in vivo*. Utilizamos estas duas abordagens para buscar respostas para o real efeito que a aplicação do ultrassom de potência causa no coração. Esta análise permitiu avaliar diferentes parâmetros de estimulação que podem interferir no ritmo cardíaco.

5.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Um resultado consistente destes experimentos foi a produção de efeito cronotrópico negativo. O ultrassom em modo *burst* não causou aumento de temperatura dentro da câmara de perfusão ou no coração perfundido, o que possibilitou descartar possíveis efeitos térmicos. Segundo Belassiano *et al.* (2011), elevação da temperatura do perfusato e efeito cronotrópico positivo foram observados *in vitro*, e danos térmicos foram encontrados *in vivo* no coração de ratos quando o ultrassom era aplicado em modo contínuo. Portanto, a opção por utilizar o ultrassom em modo *burst* foi a mais adequada.

Foi observado que a câmara de acrílico atenuava consideravelmente o ultrassom (até ~ 35%), de modo semelhante a estruturas encontradas no tórax do animal. Dessa forma, a parede da câmara pode funcionar como as diferentes estruturas encontradas no tórax do animal. A reflexão da onda ultrassônica na interface tecido ósseo/muscular é de 34,5% (HOOGLAND, 1989). Segundo Lee *et al.* (2007), vários fatores contribuem para a variabilidade dos batimentos cardíacos durante a estimulação ultrassônica. Um dos fatores seria a reflexão da onda de ultrassom ao encontrar os pulmões ou outras estruturas, ou até mesmo devido ao movimento do tórax durante a respiração. Como a velocidade do som no osso é diferente em comparação àquela em outros tecidos, há também efeitos de refração provocados pelas costelas.

Nos experimentos *in vivo* realizados por BUIOCHI (2011), o ultrassom transtorácico exerceu efeito cronotrópico negativo, com redução de 20-25% da frequência cardíaca logo ao final do período de estimulação, que se manteve por pelo menos 15 min. Nos experimentos *in vitro* deste trabalho, o efeito cronotrópico negativo mais consistente foi na frequência de repetição de pulso de 3 Hz, houve efeito cronotrópico negativo (15-20%) independente do *duty cycle* que, ao contrário do que foi observado *in vivo*, foi transitório. Não foi observado efeito inotrópico possivelmente devido à escolha de se trabalhar com *bursts*. No coração de rato ocorre uma relação força-frequência negativa, o aumento na frequência de estimulação entre 0,3 e 2 Hz causa uma diminuição na força desenvolvida (STEMMER & AKERA, 1986). Dessa forma, se o efeito cronotrópico é negativo deveria ser esperado um aumento de força, o que não ocorreu nos experimentos *in vitro*. Assim, é possível que o ultrassom também exerça um leve efeito depressor do inotropismo, que teria sido compensado pela queda da frequência cardíaca.

Em estudo *in vivo* com ultrassom de 1 MHz e alta intensidade ($2,9 \text{ W/cm}^2$) aplicado em modo contínuo a ventrículo esquerdo de cobaias, observou-se efeito inotrópico positivo (et al., 2006), sem, porém, irregularidades do ritmo cardíaco. Em estudos *in vivo* realizados com agente de contraste (ZACHARY *et al.*, 2002, SAHN, 2002, MILLER *et al.*, 2009), a presença de arritmias em corações de ratos foram atribuídas à interação do agente de contraste com o ultrassom (modo pulsado e *burst*) durante a exposição. Um estudo em corações isolados perfundidos de rato, estimulados por 30 s com *bursts* de intensidade de $1,52 \text{ W/cm}^2$ e ação de cavitação acústica, mostrou uma significativa diminuição da pressão arterial medida 2 min após a aplicação do ultrassom. O mesmo estudo (ZAKHAROV *et al.*, 1991) mostrou que o coração pode ser excitado ritmicamente por pulsos de ultrassom de duração 50 ms e intensidade até 5 W/cm^2 . Neste estudo os autores propuseram que a cavitação acústica pode induzir lesões locais e reversíveis do miocárdio, o que pode levar à geração de arritmias. No estudo atual, o coração do rato foi estimulado por 10 s com *burst* de pressão (ultrassom) variando de 2 até 3 MPa. Foram observadas alterações de ritmo (arritmias) apenas durante a estimulação com ultrassom, talvez pela interação mecânica das ondas ultrassônicas com o tecido cardíaco. Os efeitos do ultrassom sobre a atividade elétrica cardíaca parecem ser devidos à força de radiação acústica e depender da sensibilidade dos miócitos ao estiramento (TOWE & RHO, 2006). Em tecidos biológicos, a força de radiação é estimada em 0,1% a 1% da onda de pressão instantânea. Para altos níveis de potência ultrassônica, como os requeridos para estimular o coração, existe uma contribuição

adicional de pressão resultante da propagação não-linear. Para tentar investigar um possível efeito da liberação neural local de acetilcolina que, além de reduzir a frequência espontânea, também pode ter efeito arritmogênico (ZAFALON *et al.*, 2004) em alguns experimentos, o coração foi perfundido com solução contendo atropina (1 μ M) que é um bloqueador colinérgico muscarínico. Por razões ainda não esclarecidas, as preparações se deterioraram, e não foi possível determinar se os efeitos são afetados pela atropina.

Em suma, não foi possível determinar os mecanismos responsáveis pelos efeitos cronotrópico negativo e arritmogênico do ultrassom no coração isolado. No entanto, a observação de que estes efeitos restringiram-se ao período de aplicação do ultrassom são sugestivos de ação mecânica direta das ondas ultrassônicas sobre o tecido cardíaco.

5.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Nos experimentos *in vivo* realizados por Buiochi (2011) foi observado efeito cronotrópico negativo produzido pela aplicação do ultrassom de alta potência (redução de ~ 20% da frequência cardíaca basal), aparente logo após a aplicação do ultrassom, e que persistiu por 15 min. Foi observada ainda diminuição do débito cardíaco em ~17%, enquanto que arritmias de curta duração foram observadas em apenas 2 animais. No grupo preliminar do presente trabalho, utilizando o mesmo protocolo de estimulação, foi reproduzido o efeito cronotrópico do ultrassom, embora de menor magnitude (redução de ~ 7% da frequência cardíaca basal logo após a aplicação do ultrassom). A fração de ejeção e o volume diastólico final não foram significativamente afetados, e o débito cardíaco diminuiu ~ 16%, provavelmente devido à queda da frequência cardíaca, sem alteração da pré-carga. Provavelmente devido às diferentes magnitudes do efeito do ultrassom de alta potência, o impacto hemodinâmico foi diferente. A diminuição da frequência cardíaca aumenta a duração da diástole, o que deve favorecer o enchimento ventricular durante a diástole. Como esperado, no experimento proposto por Buiochi (2011) o volume diastólico final aumentou. Por outro lado, este aumento não ocorreu no experimento atual, no qual a depressão cronotrópica foi menos acentuada. Espera-se que, pelo mecanismo de Frank-Starling, aumento da pré-carga (i.e., aumento do volume diastólico final) resulte em aumento do volume ejetado. Apesar deste efeito, que poderia compensar a queda da frequência cardíaca, o débito cardíaco foi reduzido, provavelmente devido à redução desta última.

Nos experimentos posteriores, foi incluído o monitoramento da pressão arterial e a vagotomia bilateral para tentar explicar os mecanismos envolvidos na queda da frequência cardíaca. Caso a secção vagal deprimisse acentuadamente a resposta, ter-se-ia evidência da natureza reflexa da resposta. Paralelamente, monitorou-se a pressão arterial. Uma possibilidade seria que a estimulação direta dos barorreceptores aórticos pelo ultrassom poderia desencadear o reflexo baroreceptor, cuja saída se traduz num aumento do tônus parassimpático e redução do tônus simpático, com consequente bradicardia. Outra possibilidade seria o reflexo de Bezold-Jarisch. Este reflexo é um epônimo de uma tríade de respostas (apnéia, bradicardia e hipotensão), observação relatada pela primeira vez em 1867 por von Bezold e Hirt, e confirmada em 1938-1940 por Jarisch (AVIADO & GUEVARA AVIADO, 2001). Este é um reflexo cardio-inibitório que resulta em bradicardia, vasodilatação e hipotensão, é originado em receptores cardíacos, localizados principalmente na parede pósteroinferior do ventrículo esquerdo, que são ativados por estímulos mecânicos ou químicos, levando ao aumento da atividade parassimpática e à inibição da atividade simpática (MARK, 1983). Porém, nos experimentos seguintes, não foi possível obter esclarecimento quanto à natureza reflexa do efeito cronotrópico negativo evocado pelo ultrassom, uma vez que ele não se manifestou nos animais nos quais a artéria carótida foi canulada. A diferença encontrada entre os grupos ultrassom e controle pode ser atribuída a diferentes valores de frequência cardíaca média nestes grupos, e não ao efeito do ultrassom, já que não foi observada significância estatística para o efeito do tempo, ou interação entre grupo e tempo, o que indicaria diferentes evoluções temporais da frequência cardíaca dependendo do tratamento aplicado. Outra grandeza que sofreu variação significativa entre o grupo controle e ultrassom foi a pressão arterial, com um padrão muito semelhante àquele observado para a frequência cardíaca.

Por razões técnicas e para evitar incisão adicional àquela na região cervical dos animais vagotomizados, optou-se por canular a artéria carótida. No entanto, um estudo realizado por Yang *et al.* (2008), com hemorragia experimental e posterior reposição do volume de sangue retirado, demonstrou a ocorrência de convulsões ao final do experimento apenas em animais cuja carótida havia sido canulada, mas não em animais com canulação da artéria femoral, bem como se observou maior sobrevivência nestes últimos. Isto é sugestivo de que a canulação da artéria carótida possa causar algum efeito adverso sobre o sistema nervoso central, particularmente o encéfalo, possivelmente por reduzir o aporte de sangue para o encéfalo. Além disso, a presença da

cânula e/ou alterações de pressão nas regiões adjacentes a ela poderiam alterar o grau de excitação dos barorreceptores do seio carotídeo, de modo a interferir com uma possível ativação reflexa vagal pelo ultrassom. Um problema que ocorreu durante o protocolo com os animais canulados (com ou sem vagotomia) é que alguns morreram (17% dos ratos) sem chegar ao fim do protocolo. Outro estudo realizado em ratos Wistar e cobaias (PANG & SCOTT, 1980) comparando resultados após a canulação das artérias carótida e femoral, mostrou que os valores de pressão arterial medidos na artéria carótida eram maiores do que o esperado, mesmo considerando a oclusão da artéria e seu efeito sobre barorreceptores da carótida e dos mecanismos quimiorreceptores. Portanto, é provável que a canulação da artéria carótida tenha sido uma opção inadequada para estes experimentos, que teriam que ser repetidos em animais cuja pressão arterial fosse monitorada pela artéria femoral. Outra vantagem desta via de canulação seria a menor interferência mecânica da aplicação torácica do ultrassom, o que resultaria em menor ruído no registro e poderia permitir resolver as alterações agudas de frequência e ritmo cardíacas, e da pressão arterial durante a aplicação do ultrassom, o que não foi possível neste estudo.

Deste modo, ainda não sabemos se são evocados *in vivo* os mesmos efeitos cronotrópico negativo e arritmogênico, observados *in vitro*. No entanto, como o efeito cronotrópico negativo observado *in vivo* por Buiochi (2011) e no grupo preliminar do presente estudo, persistiu por minutos após a estimulação ultrassônica, ao passo que o efeito *in vitro* restringiu-se ao período de estimulação, parece provável que o efeito *in vivo* envolva outros mecanismos além da simples ação das ondas mecânicas sobre o coração. Espera-se que seja possível obter maior esclarecimento sobre tais mecanismos em estudos futuros. No entanto, a observação de depressão do cronotropismo e possível indução de arritmias cardíacas por estimulação ultrassônica com potência e frequência semelhantes àquelas comumente empregadas em fisioterapia, avança a possibilidade de que, dependendo do local e do modo de aplicação, tais efeitos, incluindo queda do débito cardíaco, possam ocorrer na situação clínica, o que requer cautela no tratamento fisioterápico, bem como estudos adicionais para maior esclarecimento dos riscos envolvidos.

5.3 RESUMO E CONCLUSÕES

A aplicação do ultrassom de alta potência, com os parâmetros de estimulação utilizados neste estudo, a corações isolados de ratos mostrou-se agudamente arritmogênica e depressora do cronotropismo, possivelmente devido à interação mecânica do ultrassom com o tecido cardíaco. Os presentes resultados in vivo indicam que a aplicação transtorácica de ultrassom pode ter impacto negativo sobre o fluxo de sangue bombeado pelo coração, por inibição do cronotropismo cardíaco. O ultrassom de alta potência exerceu efeito arritmogênico sobre o coração de ratos. Estudos adicionais são necessários para esclarecimento da gênese deste efeito, bem como para investigar sua ocorrência durante a aplicação clínica de ultrassom de alta potência.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHTON D.F., DRAPER D.O., MYRER J.W., “Temperature rise in human muscle during ultrasound treatments using Flex-All as a coupling agent”. J Athl. Train., 33:136–140, 1998.

AVIADO D.M., GUEVARA AVIADO D., “The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes”, Annals of the New York Academy of Sciences, June, 940:48-58, 2001.

BAILEY, M. R., KHOKHLOVA, V. A., SAPOZHNIKOV, O. A., KARGL, S. G., CRUM, L. A., “Physical Mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound”, Acoust Phys, v. 49, n. 4, pp. 369-388, 2003.

BELASSIANO, E., MILLER, R., O’BRIEN W.D., Jr., BUIOCHI, F., COSTA, E.T., “The role of ultrasound operation mode for safety interfering in the heart rate”, Proceedings of the Pan American Health Care Exchanges Meeting, PAHCE 2011, 254-259, 2011.

BUIOCHI E.B., **Estudo da interação do tecido cardíaco com o ultrassom.** Tese de doutoramento. Departamento Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. Unicamp, 2011.

CHAPELON, J.Y., MARGONARI J., VERNIER F., GORRY F., ECOCHARD R., GELET A., “In vivo effects of high intensity-ultrasound on prostate adenocarcinoma dunning R3327”, Cancer Research 52:6352-6357, 1992.

ECHT D.S., COWAN M.W., RILEY R.E., BRISKEN A.F., “Feasibility and safety of a novel technology for pacing without leads”, Heart Rhythm;3:1202–6, 2006.

DALECKI, D., KELLER, B.B., RAEMAN, C.H., CARSTENSEN, E.L., “Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: I. Thresholds for changes in cardiac rhythm and aortic pressure”, Ultrasound in Medicine & Biology, v. 19, pp. 385-390, 1993.

DALECKI D., KELLER B.B., RAEMAN C.H., AND CARSTENSEN E.L., “Effects of pulsed

ultrasound on the frog heart: III. The radiation force mechanism”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 23, pp. 275–285, 1997.

DALECKI, D., KELLER, B.B., RAEMAN, C.H., CARSTENSEN, E.L., NEEL, D.S., PALLADINO, J.L., NOORDERGRAAF, A., “Thresholds for premature ventricular contractions in frog hearts exposed to lithotripter fields”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 17, pp. 341-346, 1991.

DENG, C.X., QU, F., NIKOLSKI, V.P., ZHOU, Y., EFIMOV, I.R., “Fluorescence imaging for real-time monitoring of high-intensity focused ultrasound cardiac ablation”, *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, n. 10, pp. 1352-1359, 2005.

DINNO, M.A., DYSON, M., YOUNG, S.R., MORTIMER, A.J., HART, J., CRUM, L.A., “The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 34, pp. 1543-1552, 1989.

FERNANDES, L.O., COIADO O.C., BASSANI R.A., COSTA E.T., MÜHLEN S.S., “Virtual instrument for experimental studies in biological systems”, *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings 39*, pp. 1412–1415, 2012.

FISH, P., **Physics and Instruments of Diagnostic Medical Ultrasound**, 3rd ed., Chichester, John Wiley & Sons, 1994.

FORESTER, G.V., MORTIMER, A.J., ROY, O.Z., BATESON, D., KEON, W.J., “Effect of brief ultrasound exposure on post-tetanic potentiation in cardiac muscle”, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, v. 400, pp. 208-210, 1984.

FORESTER, G.V., ROY, O.Z., MORTIMER, A.J., “Enhancement of contractility in rat isolated papillary muscle with therapeutic ultrasound”, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 14, pp. 475-477, 1982.

FORESTER, G.V., ROY, O.Z., MORTIMER, A.J., “Ultrasound intensity and contractile characteristics of rat isolated papillary muscle”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 11, n. 4, pp. 591-598, 1985.

GREENBERG, S., FINKELSTEIN, A., RAISMAN, E., SHAPIRA, I., KORONOWSKI, R., LANIADO, S., KEREN, G., “Direct ultrasound application had no effect on cardiac hemodynamic performance in a baseline isolated rat heart model”, *Ultrasound in Medicine &*

Biology, v. 26, n. 2, pp. 315-319, 2000.

HARVEY, E.N., “The effect of high frequency sound waves on heart muscle and other irritable tissues”, *Am. J Physiol*, vol. 91, pp. 284–290, 1929.

HOOGLAND, R., **Ultrasound Therapy** – ENRAF NONIUS – Delft, The Netherlands, 1989.

KNISLEY, S.B., GRANT, A.O., “Asymmetrical electrically induced injury of rabbit ventricular myocytes”, *J Mol Cell Cardiol*, v. 27, pp. 1111-1122, 1995.

KRAUTHAMER, V., JONES, J.L., “Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks”, *Life Sci*, v. 60, pp. 1977-1985, 1997.

KUMA, F., UEDA, N., ITO, H., MARUYAMA, T., KAJI, Y., FUJINO, T., HARADA, M., “Effects of ultrasound energy application on cardiac performance in open-chest guinea pigs”, *Circulation Journal*, v. 70, n. 10, pp. 1356-1361, 2006.

LEE, K. L., TSE, H.F, ECHT, D.S., LAU, C.P., HEAVEN, D., SMITH, W., HOOD, M., “First Human Demonstration of Cardiac Stimulation With Transcutaneous Ultrasound Energy Delivery, Implications for Wireless Pacing With Implantable Devices”, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 50, No. 9, 2007.

LEE, K.L., TSE, H.F., ECHT, D.S., LAU, C.P, “Temporary leadless pacing in heart failure patients with ultrasound-mediated stimulation energy and the effects on the acoustic window”, *Heart Rhythm*, Vol. 6, Issue 6, p. 742-749, 2009.

MACROBBIE, A.G., RAEMAN, C.H., CHILD, S.Z., DALECKI D., “Thresholds for premature contractions in murine hearts exposed to pulsed ultrasound,” *Ultrasound Med Biol*, vol. 23, no. 5, pp. 761-765,1997.

MARK, A.L., “The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart”, *J Am Coll Cardiol*, v. 1, pp. 90-102, 1983.

MILLER, D.L., CHUNYAN, D., LUCCHESI, B.R., “Cardiac Arrhythmia and Injury Induced in Rats by Burst and Pulsed Mode Ultrasound with Gas Body Contrast Agent”, *J Ultrasound Med*. November; 28(11): 1519-1526, 2009.

MORTIMER, A.J., BRESDEN, B., FORESTER, G.V., ROY, O.Z., “System for the measurement of the effects of ultrasound on membrane electrical and mechanical properties of the

myocardium”, *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 22, pp. 24-27, 1984.

MORTIMER, A.J., ROY, O.Z., TROLLOPE, B.J., MCEWEN, J.I., TAICHMAN, G.C., FORESTER, G.V., KEON, W.J., “A relationship between ultrasonic intensity and changes in myocardial mechanics”, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 58, pp. 67-73, 1980.

NELSON T.R, FOWLKES J.B., ABRAMOWICZ J.S., CHURCH C.C, “Ultrasound biosafety considerations for the practicing sonographer and sinologist”, *J. Ultrasound Med*, 28:139-150, 2009.

NASIMI, A., HATAM, M., “The role of the cholinergic system of the bed nucleus of the *stria terminalis* on the cardiovascular responses and the baroreflex modulation in rats”, *Brain Research*, 1386, pp. 81-88, 2011.

OLIVEIRA, P.X., BASSANI, R.A., BASSANI, J.W.M., “Cytosolic Ca²⁺ accumulation in ventricular myocytes after stimulation with high-intensity electric fields (HEF)”, *Biophys J* 88, suppl 1, abstr 1514, 2005.

PANG S.C, SCOTT T.M., “Use of the common carotid artery in blood pressure measurement in rats. A possible source of error”, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol.50, pp. 1126-1127, 1980.

PETRISHCHEV, N.N., VLASOV, T.D., GALAGUDZA, M.M., MAKOV, Y.N., “Effect of low-frequency low-intensity ultrasound on contractile function of isolated heart”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, n. 4, pp. 327-329, 2002.

PETRISHCHEV, N.N., VLASOV, T.D., GALAGUDZA, M.M., MAKOV, Y.N., MINASYAN, C.M., “Frequency-dependent effects of low-intensity ultrasound on activity of isolated heart”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, n. 3, pp. 239-241, 2003.

PORTER, T.R., XIE, F., “Therapeutic ultrasound for gene delivery”, *Echocardiography*, v. 18, pp. 349-353, 2001.

ROBINSON, E.S., BUONO, J.M., “Effect of continuous wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle”, *Physical Therapy*, v. 75, pp. 145-149, 1995.

SAHN, D.J., “Arrhythmias in rat hearts exposed to pulsed ultrasound after intravenous injection of a contrast agent”, *Journal of Ultrasound in Medicine*, 21 (12) , pp. 1343-1345, 2002.

SALZ, H., ROSENFELD, E.H., WUSSLING, M., “Effect of ultrasound on the contraction of isolated myocardial cells of adult rats”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 23, n. 1, pp. 143-149., 1997.

SINGH, M., ROSENSCHEIN, U., HO, K.K.L., BERGER, P.B., KUNTZ, R., HOLMS, D.R., “Treatment of saphenous vein bypass grafts with ultrasound thrombolysis: a randomized study“, *Circulation*, v. 107, pp. 2331-2336, 2003.

SMAILYS, A., DULEVICIUS, Z., MUCKUS, K., DAUSKA, K., “Investigation of the possibilities of cardiac defibrillation by ultrasound”, *Resuscitation*, v. 9, pp. 233-242, 1981.

STEMMER P., AKERA T., “Concealed positive force-frequency relationships in rat and mouse muscle revealed by rianodine”, *Am J Physiology*, dez, 251 (6 PT 2): H1106-10, 1986.

TER HAAR, G.R., DANIELS, S., EASTAUGH, K.C., HILL, C.R., “Ultrasonically induced cavitation *in vivo*”, *Br.J. Cancer*, 45 suppl. V:151:155, 1982.

TOWE, B.C., RHO, R., “Ultrasonic cardiac pacing in the porcine model”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 53, n. 7, pp. 1446-1448, 2006.

TUNG, L., “Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle”, *Proc IEEE* 84, pp. 366-378, 1996.

VALENTI, V.E., ABREU, L.C, SATO, M.A., SALDIVA, P.H.N., FONSECA, F.L.A., GIANNOCO, G, RIERA, A.R.P., FERREIRA, C., “Central n-acetylcysteine effects on baroreflex in juvenile spontaneously hypertensive rats”, *Journal of Integrative Neuroscience (JIN)*, vol.10, issue 2, pp.161-176, 2011.

VYKHODTSEZA, N.I., HYNYNEN, K., DAMIANOU, C., “Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain *in vivo*”, *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 21, n. 7, pp. 969-979, 1995.

YANG, R., TAN, X., KENNEY, R.J., JR., THOMAS, A., LANDIS, M., QURESHI, N., MORRISON, D.C., VAN WAY III, C., “Hemorrhagic Shock in the Rat: Comparison of Carotid and Femoral Cannulation”, *Journal of Surgical Research* 144, 124–126, 2008.

ZACHARY, J. F., HARTLEBEN, , S. A., FRIZZEL, L. A., O’BRIEN, W. D., “Arrhythmias in rat hearts exposed to pulsed ultrasound after intravenous injection of a contrast agent”, *J Ultras Med*,

v. 21, pp. 1347-1356, 2002.

ZAFALON Jr, N., BASSANI, J.W.M., BASSANI, R.A., “Cholinergic-adrenergic interaction in the induction of tachyarrhythmia by electric stimulation in isolated rat atria”, *J Mol Cell Cardiol*, v. 37, pp. 127-135, 2004.

ZAKHAROV, S.I., BOGDANOV, K.Y., ROSENSHTRAUKH, L.V., “Arrhythmogenic action of acoustic cavitation on the isolated rat heart perfused with physiological saline”, *Physiology*, Vol. 111, No. 5, pp. 451-453, May, 1991.

ZHAO, G., WALSH, E., SHRYOCK, J.C., MESSINA, E., WU, Y., ZENG, D., XU, X., OCHOA, M., BAKER, S.P, HINTZE, T.H., BELARDINELLI, L., “Antiadrenergic and Hemodynamic Effects of Ranolazine in Conscious Dogs”, *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 57, n. 6, pp. 639-647, 2011.

WILLIAMS, R., “Production and transmission of ultrasound”, *Physiotherapy*; 73:113–116, 1987.

APÊNDICE A

PROTOCOLO EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Amplificador de RF (VP)	Gerador de sinais (Vpp)	# de ciclos	FRP (Hz)	PRP (ms)	Tempo (s)
					20
196	2,0	5000 ciclos (2,5ms) 1% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
248	2,5	5000 ciclos (2,5ms) 1% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
276	3,0	5000 ciclos (2,5ms) 1% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
196	2,0	12500 ciclos (5ms) 2,5% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
240	3,0	12500 ciclos (5ms) 2,5% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
392	3,5	12500 ciclos (5ms) 2,5% duty cycle	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20

Amplificador de RF (VP)	Gerador de sinais (Vpp)	# de ciclos	FRP (Hz)	PRP (ms)	Tempo (s)
					20
140	1,0	25000 ciclos (2,5ms) <i>5% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
220	1,5	25000 ciclos (2,5ms) <i>5% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
320	2,0	25000 ciclos (2,5ms) <i>5% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
140	1,0	50000 ciclos (5ms) <i>10% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20
220	1,5	50000 ciclos (5ms) <i>10% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20s
					20
320	2,0	50000 ciclos (5ms) <i>10% duty cycle</i>	3	333	20
			2	500	20
			1	1	20
					20

APÊNDICE B

SCRIPT EM AMBIENTE MATLAB

```
load Pasta2.txt
aux=Pasta2;

t = aux(:,1);
a = aux(:,2)-min(aux(:,2));
b = aux(:,3);

figure(1)
plot(t,a,t,b/max(b)*0.19,'r')
xlabel('Tempo (s)')
ylabel('Amplitude (volts)')
grid
axis([0,30,0,.2])

pontos = 10;
Ipicos = [];
for i=pontos+1:length(t)-pontos,
if (a(i-1:-1:i-pontos) <= a(i)) & (a(i+1:1:i+pontos) < a(i)),
Ipicos = [Ipicos, i];
end
end
figure(2)
plot(t,a,t,b/max(b)*0.19,'r',t(Ipicos),a(Ipicos),'ro')

tempoPicos = t(Ipicos);
T = tempoPicos(2:length(tempoPicos))-tempoPicos(1:length(tempoPicos)-1);
bpm=60./T;
figure(3)
plot(tempoPicos(1:length(Ipicos)-1),bpm)
```

APÊNDICE C

MATERIAIS DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Nome do Material	Companhia	Número	Observações
Fenilefrina hidro cloreto 5 g	Sigma-Aldrich	P6126	Pó hidrosolúvel
Terg-A-Zyme®	Sigma-Aldrich	Z27328-7	
RenaSil Tubo de silicone	Braintree Scientific, Inc.	SIL 080	.080 OD"x .040 ID" bobina de 741,75 cm
Sistema de retratores magnéticos	Fine Science Tools	18200-50	Kit para animais até 200 g (No. 18200-20) incluem: 1 Base pequena (No. 18200-03) • 2 Fixadores pequenos (No. 18200-01) 2 Fixadores grande (No. 18200-02) 1 elastômero, rolo de 2m (No. 18200-07) pacote de retratores, 1mm (No. 18200-09) 1 pacote de retratores, 2,5mm (No. 18200-10)
Sutura cirúrgica não-estéril	Fine Science Tools	18020-60	Linha tamanho 6-0
NI USB-TC01 Sistema de medição e sonda tipo termopar	National Instruments	781314-03	
Transdutor de pressão Samba Preclin 420LP	Biopac Systems, Inc.	TSD174A	Raio 50-350 4m/5cm Serie 200
Unidade de Controle de pressão arterial Samba 201	Biopac Systems, Inc.	MPMS100A -1	
Tesouras	Md Supplier	V95-306	4-1/8" (10.5 cm), curva
Micro tesouras	Ted Pella Inc.	1346	Retas, 80mm L
Pinças	Ted Pella Inc.	5627	115mm 0.17x0.10mm
Agulhas	Becton Dickson and	DG33602	30G1/2

	Company		
Agulhas	Becton Dickson and Company	DG26102	18G11/2
Seringa 1ml	Becton Dickson and Company	309628	
Lâminas cirúrgicas de aço inox	Exel int	29515	Número 22
Escalpele	Ted Pella Inc.	549-4	No. 4, 13.7cm L, No. 22
Fórceps	Ted Pella Inc.	53071	Tipo mosquito, curvo, dente 1x2, 12.7cm (5")
Fórceps de dissecação	Ted Pella Inc.	5002-9	Curvo, 120 mm L (4-3/4")
Fórceps de tecido com dentes	Ted Pella Inc.	13220	Dente 1 x 2 127mm (5")
Visor	Jorgensen Laboratories Inc.	J801E	Lentes ópticas de amplificação 3.5X@4" (número 7)
Prato de aquecimento para animais	SnuggleSafe	S100816560	

ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – CEUA/UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

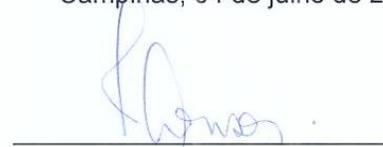
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo dos efeitos do ultrassom de potência sobre o coração" (protocolo nº 2479-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa / Profa. Dra. Rosana Almada Bassani / Olivia Campos Coiado, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de julho de 2011.

Campinas, 04 de julho de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2 -APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – IACUC/UIUC

**University of Illinois
Institutional Animal Care and Use Committee
114 Observatory Building (MC-193)
333-7789
244-7963 fax**

TO: William O'Brien
FROM: Ed Roy, Chair
DATE: November 18, 2011
SUBJECT: Approval of Amendment to Animal Care and Use Protocol

Your request to amend your animal care and use protocol #10104 entitled "The Interaction of Ultrasound with Cardiac Tissue" was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on November 18, 2011. A summary of the requested changes that have been approved with this amendment is as follows:

The following individuals have been added to the protocol personnel: Olivia Coiado. (The principal investigator is responsible for ensuring adequate training of all individuals.)

Please note that further changes in the project, animal numbers, or personnel must receive approval by the IACUC.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the IACUC staff.

kbb