

ELAINE BELASSIANO BUIOCHI

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO ULTRASSOM COM O TECIDO CARDÍACO

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica. Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosana Almada Bassani.

CAMPINAS

2011

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

B868e Buiochi, Elaine Belassiano
Estudo da interação do ultrassom com o tecido
cardíaco / Elaine Belassiano Buiochi. --Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

Orientadores: Eduardo Tavares Costa, Rosana
Almada Bassani.

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

1. Arritmia. 2. Transdutores ultrassônicos. 3.
Ultrassom na medicina - Uso terapêutico. 4. Ondas
ultrassônicas - Efeito fisiológico. I. Costa, Eduardo
Tavares. II. Bassani, Rosana Almada. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica
e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Study of the interaction of ultrasound with cardiac tissue
Palavras-chave em Inglês: Arrhythmia, Ultrasound transducers, Ultrasound
in medicine - Therapeutic use, Sound waves -
Physiological effect

Área de concentração: Engenharia Biomédica

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Julio Cezar Adamowski, Wagner Coelho de
Albuquerque Pereira, Vera Lúcia da Silveira Nantes
Button, Wilson Nadruz Junior

Data da defesa: 01.06.2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

Candidata: Elaine Belassiano Buiochi

Data da Defesa: 1 de junho de 2011

Título da Tese: "Estudo da interação do ultrassom com o tecido cardíaco"

Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa (Presidente):

Prof. Dr. Julio Cesar Adamowsky:

Prof. Dr. Wagner Coelho de Albuquerque Pereira:

Profa. Dra. Vera Lúcia da Silveira Nantes Button:

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior:

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido, Flávio, pelo amor, compreensão,
incentivo, companheirismo e dedicação.*

*Aos meus pais, Marcos e Angela, fontes de inspiração e
equilíbrio, pelo carinho, pelo apoio, e por me
presentearem com a melhor educação possível.*

*Aos meus irmãos, Guilherme e Marcelo, pela nossa
união, por formarmos uma equipe.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo T. Costa, pela oportunidade, segurança, confiança, otimismo e tranquilidade.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Rosana A. Bassani, pela disponibilidade, pelas correções precisas e pelo conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. José Wilson M. Bassani, por abrir as portas do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular para um projeto conjunto com o Laboratório de Ultrassom.

À Profa. Dra. Vera Lúcia S. N. Button, pela serenidade e grande apoio.

Ao Prof. Dr. Wagner C. A. Pereira, da COPPE/UFRJ, pelo suporte em tempo real, pela eterna motivação, pelos preciosos ensinamentos, não só sobre ultrassom, como também sobre a psicologia humana.

Ao Prof. Dr. William O'Brien, do *Bioacoustics Research Laboratory* da *University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC)*, pela humildade, paciência e hospitalidade, por acreditar no projeto e na minha capacidade de aprender e contribuir, pela oportunidade de compartilhar de sua experiência, desde os preparativos para a viagem até hoje.

A todos os colegas da *University of Illinois*, especialmente Rita Miller, Emily Hartman, Michael Kurowski, Lauren Wirtzfeld, e Susan Clay, por facilitarem os meus dias e por fazerem as coisas acontecerem.

Ao Prof. Dr. Julio C. Adamowski, Prof. Dr. Flávio Buiochi, Dr. Marco Aurélio B. de Andrade, Eng. Allan T. de Souza e Dr. Nicolas Perez, do Laboratório de Ultrassom do Departamento de Engenharia Mecatrônica e de Sistemas Mecânicos da Escola Politécnica da USP, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Francisco M. de Espinosa e ao Prof. Dr. Enrique Riera, do *Instituto de Acustica do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IA-CSIC)* por abrirem as portas de seus laboratórios e dividirem seus conhecimentos.

À minha amiga Olívia Campos Coiado, pela nossa afinidade desde o momento em que nos conhecemos, pelas longas conversas e pelo incentivo.

À Elizângela S. de Oliveira, técnica do biotério do CEB/UNICAMP, pela competência em seu trabalho, que muito ajudou o meu trabalho.

Aos colegas do Departamento de Engenharia Biomédica, pelas tarefas em grupo e estudos conjuntos enquanto cursei as disciplinas, e pelos momentos de descontração nos congressos. Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica, pelo convívio e ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado, que me deu a oportunidade de realizar dois estágios no exterior, um em Madri, Espanha, e outro em Illinois, E.U.A., e de participar de um congresso internacional em Innsbruck, Áustria.

Ao National Institutes of Health (NIH) por financiar o projeto sobre efeitos biológicos do ultrassom do *Bioacoustics Research Laboratory - UIUC*, no qual o meu projeto se encaixou durante meu estágio.

*“Um pessimista vê dificuldade em cada oportunidade;
um otimista vê oportunidade em cada dificuldade.”*

*“A pessimist sees the difficulty in every opportunity; an
optimist sees the opportunity in every difficulty.”*

-Winston Churchill

RESUMO

No ultrassom diagnóstico faz-se uso de ondas acústicas de baixa intensidade para investigar os tecidos biológicos, sendo uma técnica não invasiva. Ondas ultrassônicas de maior intensidade podem alterar as características do tecido, e isto é de interesse para aplicações terapêuticas, nas quais a ocorrência de efeitos biológicos é, até certo ponto, desejável. Com relação à cardiologia, o uso do ultrassom diagnóstico é bem estabelecido, enquanto há um potencial inexplorado para aplicações terapêuticas. Soma-se a isso o fato de que os tratamentos disponíveis para as arritmias com estimulação elétrica são limitados por sérias complicações, incluindo infecção sistêmica, choques desnecessários, potencial para pró-arritmia, falha em estimular e, até mesmo, morte. O ultrassom pode se mostrar uma alternativa atraente à estimulação elétrica, porém há poucos estudos sobre a possibilidade de aplicação do ultrassom para o tratamento de arritmias. O objetivo deste estudo foi desenvolver transdutores ultrassônicos de potência e usá-los para investigar conjuntos de parâmetros acústicos capazes de interferir na atividade cardíaca, sem provocar danos teciduais, buscando possíveis aplicações terapêuticas do ultrassom em cardiologia. Os parâmetros acústicos variados foram frequência de ressonância, modo de operação, frequência de repetição de pulso, e pressão de saída. Dois dos sete transdutores construídos se mostraram mais eficientes e, portanto, foram calibrados e usados nos experimentos biológicos. Em experimentos preliminares realizados em corações isolados de ratos Wistar, foi observada geração esporádica de arritmia usando-se o transdutor de 65 kHz, e aumento da frequência espontânea, acompanhada por redução da força de contração do miocárdio, usando-se o transdutor de 1MHz em exposição contínua prolongada. Em estudos *in vivo*, dez ratos Sprague-Dawley foram anestesiados com isoflurano e expostos a uma seqüência terapêutica de ultrassom, e outros cinco ratos foram usados como grupo controle. A estimulação ultrassônica consistiu de *bursts* de 1MHz, ciclo de trabalho de 1%, pico de pressão negativa de 3MPa ($I_{SPTA}=3W/cm^2$), e frequência de repetição de pulso variável e decrescente. O ultrassom transtorácico exerceu efeito cronotrópico negativo, uma vez que foi capaz de reduzir a frequência cardíaca em 19% logo ao final do período de estimulação. Os efeitos duraram, no mínimo, 15 minutos, sem aparente prejuízo hemodinâmico, que foi monitorado principalmente por meio da medição da fração de ejeção. Trata-se de um fenômeno promissor para o tratamento de taquiarritmias. O regime de exposição utilizado excluiu efeitos térmicos, de forma que o efeito observado foi provavelmente resultante de mecanismos não-térmicos, possivelmente da força da radiação. A variação na frequência de repetição de pulso parece ter sido a chave para a indução do efeito em questão, uma vez que experimentos realizados com frequências de repetição constantes não resultaram em tal efeito.

Palavras-chave: arritmia, danos teciduais, efeito cronotrópico, estimulação ultrassônica, transdutores ultrassônicos, ultrassom terapêutico.

ABSTRACT

Diagnostic ultrasound consists of application of low intensity acoustic waves to noninvasively investigate biological tissues. Higher ultrasound intensities may alter tissue characteristics, and this is of interest for therapeutic applications, when the occurrence of bioeffects is – to a certain extent – desirable. The use of diagnostic ultrasound in Cardiology is well established, although there is an unexplored potential for therapeutic applications. The currently available treatments of arrhythmias by electrical stimulation are limited by serious complications, including systemic infection, inappropriate shock delivery, proarrhythmia, failure to pace and to defibrillate, and even death. Ultrasound can be an interesting alternative for electrical stimulation, but there are only a few studies that investigate the possibility of applying ultrasound for treating arrhythmias. The objective of this study was to develop power ultrasonic transducers to be applied to the investigation of sets of acoustical parameters able to interfere with the cardiac activity without causing tissue damage, thus aiming at potential therapeutic applications of ultrasound in cardiology. The acoustical parameters investigated were resonance frequency, operation mode, pulse repetition frequency, and output pressure. The two most efficient out of the seven transducers built were calibrated and used in biological experiments. In preliminary experiments conducted on isolated hearts from Wistar rats, arrhythmia was sporadically observed at the onset of ultrasound application using the 65kHz transducer, whereas an increase in spontaneous beating rate accompanied by a reduction in the force developed by the myocardium occurred during continuous, prolonged exposure using the 1MHz transducer. In *in vivo* studies, ten Sprague-Dawley rats were anesthetized with isoflurane and exposed to a sequence of therapeutic ultrasound, and other five rats were used as a control group. The ultrasonic stimulation consisted of 1-MHz bursts of 1% duty cycle, 3 MPa peak negative pressure ($I_{SPTA}=3W/cm^2$), and decreasingly variable pulse repetition frequencies. Transthoracic ultrasound application was able to promote a negative chronotropic effect, decreasing the heart rate by 19% just after stimulation ceased. The effect lasted at least 15 minutes, without apparent alteration of pumping function, which was monitored mainly by evaluation of the ejection fraction. This phenomenon is promising for treating tachyarrhythmias. The insonification scheme used in this study excluded thermal effects, so the observed effect seems to have resulted from nonthermal mechanisms, possibly from radiation force. The variation in the pulse repetition frequency seems to be the key element for induction of the described effect, because the latter was not observed for constant repetition rates.

Keywords: arrhythmia, chronotropic effect, therapeutic ultrasound, ultrasonic stimulation, ultrasound transducers, tissue damage.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEB/UNICAMP	Centro de Engenharia Biomédica / Universidade Estadual de Campinas
CEMIB/UNICAMP	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório / Universidade Estadual de Campinas
CT	ciclo de trabalho
CW	onda contínua
<i>DAR/UIUC</i>	<i>Division of Animal Resources / University of Illinois at Urbana-Champaign</i>
DP	desvio padrão
ECG	eletrocardiograma
EP	erro padrão
FC	frequência cardíaca
FE	fração de ejeção
FR	frequência respiratória
FRP	frequência de repetição do pulso
GL	graus de liberdade
<i>IA / CSIC</i>	<i>Instituto de Acústica – Consejo Superior de Investigaciones Científicas</i>
IB/UNICAMP	Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas
IC	intervalo de confiança
LUS	Laboratório de Ultrassom
LPCv	Laboratório de Pesquisa Cardiovascular

NORM.	valores normalizados
PZT	titanato zirconato de chumbo
PVDF	fluoreto de polivinilideno
PRP	período de repetição do pulso
RF	radiofrequência
SAC _K	canais de potássio seletivos
SAC _{NS}	canais de cátions não-seletivos
SQ	soma dos quadrados
VAC _{Cl}	canais de cloreto seletivos

LISTA DE SÍMBOLOS

a	aceleração da partícula
A	área
α	coeficiente de atenuação
c	velocidade de propagação
c	calor específico
dF/dt	taxa de aumento da força sistólica
$-dF/dt$	taxa de relaxamento do miocárdio
dP/dt_{max}	derivada do aumento da pressão ventricular esquerda
dP/dt_{min}	derivada da redução da pressão ventricular esquerda
dQ/dt	fluxo de momento
ΔT	<i>variação da temperatura</i>
Δt	duração da exposição
f	frequência
f_r	frequência de ressonância
F	estatística F
F	força de radiação acústica
g	gravidade
G	condutância elétrica
G_r	condutância de radiação
I	intensidade
I_{SP}	intensidade pico espacial (<i>spatial peak</i>)
I_{SPPA}	intensidade pico espacial – média no pulso
I_{SPTA}	intensidade pico espacial – média temporal
I_{SPTP}	intensidade pico espacial – pico temporal
I_{SA}	intensidade média espacial
I_{SAPA}	intensidade média espacial – média no pulso
I_{SATA}	intensidade média espacial – média temporal

I_{SATP}	intensidade média espacial – pico temporal
λ	comprimento de onda
m	massa da partícula
p	p-valor
p	pressão acústica
p_r	pressão de rarefação
p_{spta}	pressão pico espacial –média temporal
P_{max}	pressão ventricular esquerda
ρ	densidade
t	tempo
T	período de onda
T_b	temperatura do banho
T_m	temperatura central do músculo
τ	duração do pulso
U_y	deslocamento na direção y
v	velocidade da partícula
V_e	tensão elétrica RMS
V_{pp}	tensão elétrica de pico-a-pico
W	potência ultrassônica

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	1
-----------------	---

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA.....	5
----------------------------	---

CAPÍTULO III

ULTRASSOM.....	17
III. 1. DEFINIÇÃO.....	17
III. 2. MECANISMOS QUE ACARRETAM EFEITOS BIOLÓGICOS.....	18
III. 3. CONSIDERAÇÕES SOBRE INTENSIDADES.....	22

CAPÍTULO IV

O CORAÇÃO.....	25
IV. 1. ATIVIDADE CARDÍACA.....	25
IV. 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE ARRITMIAS.....	26
IV. 3. TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA ARRITMIAS.....	28
IV. 3. 1. Ablação por radiofrequência.....	28
IV. 3. 2. Estimulação elétrica.....	28
IV. 3. 3. Estimulação mecânica.....	30

CAPÍTULO V

TRANSDUTORES ULTRASSÔNICOS DE POTÊNCIA.....	33
V. 1. MODELAGEM.....	35
V. 2. CONSTRUÇÃO.....	42
V. 3. CARACTERIZAÇÃO EM FREQUÊNCIA.....	44

V. 4. CALIBRAÇÃO.....	50
V. 1. 1. Balança de força de radiação.....	50
V. 1. 1. Hidrofonos	52

CAPÍTULO VI

EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>.....	57
VI. 1. METODOLOGIA.....	58
VI. 1. 1. Animais.....	58
VI. 1. 2. Montagem experimental.....	61
VI. 1. 3. Experimentos preliminares.....	63
VI. 1. 4. Sequências experimentais.....	64
VI. 2. RESULTADOS.....	65
VI. 2. 1. Experimentos preliminares.....	65
VI. 2. 2. Sequências experimentais.....	67
VI. 2. 3. Análise estatística.....	70
VI. 3. DISCUSSÃO.....	80

CAPÍTULO VII

EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.....	87
VII. 1. METODOLOGIA.....	87
VII. 1. 1. Animais.....	87
VII. 1. 2. Montagem experimental.....	88
VII. 1. 3. Sequências experimentais.....	91
VII. 2. RESULTADOS.....	93
VII. 2. 1. Excitação contínua.....	93
VII. 2. 2. Temperatura.....	95
VII. 2. 3. Frequências de repetição de pulso fixa e variável.....	96
VII. 2. 4. Frequência de repetição de pulso variável e grupo controle.....	100
VII. 3. DISCUSSÃO.....	113

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÃO.....119

VIII. 1. Trabalhos futuros.....120

VIII. 2. Publicações.....121

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....123

ANEXO 1 – Aprovação do comitê de ética – CEUA/UNICAMP.....133

ANEXO 2 – Análise Estatística (MATLAB).....135

ANEXO 3 – Aprovação do comitê de ética – IACUC/UIUC.....143

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Em medicina, o ultrassom vem sendo aplicado tanto em diagnóstico quanto em terapia, sendo uma técnica não-invasiva. Sua ampla aceitação no meio médico estimula a pesquisa para aprimoramento de técnicas já existentes, bem como para desenvolvimento de novas aplicações.

A relevância do estudo de efeitos do ultrassom nos tecidos biológicos reside nos fatos de que, se indesejados, podem limitar a intensidade de exposições, assim como limitar o volume de agente de contraste utilizado em aplicações clínicas, e se desejados, podem ser aplicados em procedimentos terapêuticos. A ocorrência de efeitos biológicos depende de combinações de parâmetros acústicos, as quais devem ser determinadas experimentalmente (PETRISHCHEV *et al.*, 2003; TOWE & RHO, 2006).

De acordo com os parâmetros empregados, o ultrassom pode interagir de diversas formas com os diferentes tecidos biológicos, sendo inclusive capaz de exercer funções antagônicas, como restabelecer o fluxo sanguíneo (trombólise – baixa intensidade) e estancar o sangramento (hemostasia – alta intensidade) (BAILEY *et al.*, 2003). Há um crescente emprego do ultrassom terapêutico, sendo aplicado, por exemplo, em fisioterapia, sonoforese, trombólise, hipertermia, hemostasia e litotripsia (DALECKI, 2004).

Apesar de o ultrassom diagnóstico ser muito bem estabelecido em cardiologia, há um potencial inexplorado para aplicações terapêuticas. A literatura relata possibilidades de utilização do ultrassom como marca-passo (TOWE & RHO, 2006), para tratamento não-farmacológico da insuficiência cardíaca (KUMA *et al.*, 2006), para desfibrilação (SMAILY *et al.*, 1981), terapia gênica cardíaca (PORTER & XIE, 2001) e ablação para tratamento de arritmias (DENG *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2006).

Sendo os tratamentos disponíveis para arritmias limitados por uma baixa eficácia e por graves efeitos colaterais (MARBAN, 2002), o ultrassom apresenta-se como uma fonte alternativa. O ultrassom tem características diferentes quando comparado à energia elétrica e, assim, sua interferência na atividade cardíaca pode ser útil para tratar arritmias.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a potencialidade do ultrassom como uma opção para o tratamento de arritmias. O principal desafio foi encontrar o melhor conjunto de parâmetros acústicos capazes de produzir efeitos cronotrópicos sem produzir outros efeitos indesejados, como, por exemplo, prejudicar a atividade contrátil. Para isso, foram construídos transdutores ultrassônicos de potência com diversas frequências de ressonância. A excitação de tais transdutores seguiu os protocolos experimentais estabelecidos empiricamente, de forma que vários conjuntos de parâmetros acústicos foram testados.

As diversas etapas de desenvolvimento do trabalho foram realizadas nos seguintes laboratórios e grupos de pesquisa:

1. Laboratório de Ultrassom (LUS) do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP (Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa)

2. Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv) do Centro de Engenharia Biomédica da UNICAMP (Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani e Profa. Dra. Rosana Almada Bassani, co-orientadora deste trabalho).

3. Laboratório de Ultrassom (LUS) do Departamento de Engenharia Mecatrônica e de Sistemas Mecânicos da Escola Politécnica da USP (Prof. Dr. Julio Cezar Adamowski e Prof. Dr. Flávio Buiochi).

4. *Departamento de Señales, Sistemas y Tecnologías Ultrasónicas / Instituto de Acústica / Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IA/CSIC)* (Prof. Dr. Francisco Montero de Espinosa).

5. *Grupo de Ultrasonidos de Potencia / Instituto de Acústica / Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IA/CSIC)* (Prof. Dr. Enrique Fernando Riera Franco de Sarabia).

6. *Bioacoustics Research Laboratory / University of Illinois at Urbana-Champaign (BRL/UIUC)* (Prof. Dr. William D. O'Brien Jr.).

Neste primeiro capítulo tem-se uma breve descrição da motivação e objetivos do trabalho. O capítulo II é dedicado a uma extensa revisão da literatura sobre a aplicação terapêutica do ultrassom em cardiologia. Nos capítulos III e IV abordam-se, respectivamente, fundamentos teóricos de ultrassom e de cardiologia. O capítulo V apresenta as etapas de desenvolvimento de transdutores ultrassônicos de potência a serem usados durante os experimentos em animais. Os capítulos VI e VII relatam os diversos experimentos realizados em animais (*in vitro* e *in vivo*). No capítulo VIII expõem-se as principais conclusões levantadas a partir de todo o estudo, enfatizando-se a relevância dos resultados experimentais obtidos.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Efeitos biológicos podem ser provocados nos tecidos em decorrência da exposição a campos ultrassônicos. As Tabelas II.1, II.2 e II.3 resumem estudos sobre a interação do ultrassom com diferentes amostras de tecido cardíaco, revelando os parâmetros acústicos aplicados e os principais resultados obtidos.

Tabela II.1 – Estudos sobre a influência do ultrassom sobre o coração *in vivo*.

<u>GRUPO:</u>	<u>AMOSTRA:</u>	<u>PARÂMETROS DO US:</u>	<u>RESULTADOS:</u>
KUMA <i>et al.</i> , 2006	cobaias Hartley (<i>in vivo</i>)	1MHz; contínuo por 1 min; focalizado (80mm de profundidade; 16mm de diâmetro); alta intensidade ($I_{SATA} = 2,9W/cm^2$).	Efeitos inotrópico e lusitrópico positivos; aumento do fluxo sanguíneo na aorta; possível aplicação na insuficiência cardíaca.
TOWE & RHO, 2006	porco (<i>in vivo</i>)	70kHz; pulsos de 5ms; FRP de 1,4 a 2Hz; 3MPa.	Marca-passo cardíaco: resposta dos miócitos ao estiramento.
ROTA <i>et al.</i> , 2006	camundongo (<i>in vivo</i>) na presença de agente de contraste	200kHz; 1 pulso de 1ms durante a diástole.	Contração prematura relacionada à cavitação inercial.
MACROBBIE <i>et al.</i> , 1997	camundongo (<i>in vivo</i>)	1,2MHz; um pulso de 5ms; limiar de 2MPa durante a diástole (T-P)	Contração prematura.
DALECKI <i>et al.</i> , 1993b	rã (<i>in vivo</i>)	1 pulso de 5ms durante a sístole (QRS); limiar entre 5MPa e 10MPa, tanto a 1,2MHz quanto a 3,7MHz.	Redução da pressão aórtica não relacionada a mecanismos térmicos.
DALECKI <i>et al.</i> , 1993a	rã (<i>in vivo</i>)	1,2MHz; 1 pulso de 5ms durante a diástole; limiar entre 5MPa ($I_{SPPA} = 350W/cm^2$) e 10MPa ($I_{SPPA} = 1000W/cm^2$).	Contração prematura associada à redução do inotropismo ou prolongamento do relaxamento.
SMAILYS <i>et al.</i> , 1981	cão (<i>in vivo</i>)	500kHz; contínuo; $I = 4W/cm^2$; até 2 min.	Desfibrilação. Efeito anti-arritmico.

Tabela II.2 – Estudos sobre a influência do ultrassom sobre o coração isolado e sobre cardiomiócitos isolados.

<u>GRUPO:</u>	<u>AMOSTRA:</u>	<u>PARÂMETROS DO US:</u>	<u>RESULTADOS:</u>
GREENBERG <i>et al.</i> , 2000	rato coração isolado	1MHz; contínuo por 15 min; $2\text{W}/\text{cm}^2$ (I_{SATA}).	NÃO houve alterações em parâmetros contráteis (P_{max} , dP/dt_{max} , dP/dt_{min} e integral pressão-tempo).
SALZ <i>et al.</i> , 1997	rato cardiomiócitos isolados	10MHz; contínuo por 3 min; p_{spta} : 0,15MPa.	Redução do limiar de excitação elétrica em aprox. 10%; NÃO houve efeito inotrópico positivo.
SALZ <i>et al.</i> , 1997	rato cardiomiócitos isolados	2,25MHz; contínuo por 3 min; p_{spta} : 0,3MPa.	NÃO houve efeito inotrópico positivo.
SMAILY <i>et al.</i> , 1981	coelho cardiomiócitos isolados	500kHz; contínuo; $I = 4\text{W}/\text{cm}^2$; 30s.	Prolongamento do período refratário.

A aplicação de ultrassom com frequência de 500kHz e intensidade de $10\text{W}/\text{cm}^2$ exerceu efeito anti-arrítmico em cães. Provocou-se eletricamente fibrilação com pulsos de onda quadrada de até 5V. Em dois a três testes-controle iniciais, se em até 1,5 a 2 minutos não houvesse desfibrilação espontânea, realizava-se a desfibrilação elétrica. Durante os experimentos, após a fibrilação, o ultrassom foi aplicado ao coração por 1,5 a 2 minutos, até que a fibrilação cessasse. Caso continuasse, procedia-se à desfibrilação elétrica. Na maioria dos experimentos em que o ultrassom exerceu efeito desfibrilatório, após duas a quatro desfibrilações, observou-se desfibrilação espontânea, a qual não foi observada nos testes-controle iniciais (SMAILY *et al.*, 1981).

Estudos eletrofisiológicos no ventrículo direito isolado de coelhos demonstraram que o ultrassom de 500kHz com intensidade de $4\text{W}/\text{cm}^2$ e duração de 30s prolongou o período refratário das células miocárdicas, sendo apontado como um dos mecanismos responsáveis pelo efeito anti-arrítmico observado (SMAILY *et al.*, 1981).

Tabela II.3 – Estudos sobre a influência do ultrassom sobre o tecido cardíaco

<u>GRUPO:</u>	<u>AMOSTRA:</u>	<u>PARÂMETROS</u> <u>DO US:</u>	<u>EST.</u> <u>ELÉTRICO:</u>	<u>RESULTADOS:</u>
FORESTER <i>et al.</i> , 1985	rato músculo papilar isolado	963kHz; modo contínuo; I_{SATA} : 0,25; 0,5; 1; 1,5; $2W/cm^2$.	6, 60, 120 e 240 contrações/min.	Inotropismo linearmente relacionado à intensidade; aumento no pico da força, aumento em dF/dt e $-dF/dt$
FORESTER <i>et al.</i> , 1984	rato músculo papilar isolado	963kHz; <i>burst</i> de 4s; I_{SATA} : $1W/cm^2$.	Trem de pulsos potencializador pós-tetânico.	Janela temporal ótima para aumento da força (US começa antes e vai até o meio do trem de pulsos: temperatura média aumenta em $0,5^{\circ}C$, picos de 2 a $4^{\circ}C$).
MORTIMER <i>et al.</i> , 1984	rato músculo papilar isolado	953kHz; modo contínuo; I_{SATA} : $1,5W/cm^2$.		Redução da força diastólica; aumento na amplitude do PA; hiperpolarização do potencial de repouso.
FORESTER <i>et al.</i> , 1982	rato músculo papilar isolado	963kHz; modo contínuo; I_{SATA} : $1W/cm^2$.	6, 30, 60, 120 e 360 contrações/min.	Redução da força diastólica; aumento da força sistólica.
MORTIMER <i>et al.</i> , 1980	rato músculo papilar isolado	2,3MHz; modo contínuo; I_{SATA} : 1,1; 2,2; $3,3W/cm^2$.	3 pulsos/min; pulsos de 5ms.	Redução da força diastólica.
ZAKHAROV <i>et al.</i> , 1989	rato músculo papilar isolado	543kHz, contínuo, $I_{SATA} = 3W/cm^2$.		despolarização reversível na membrana celular, perda de excitabilidade e aumento de $53.1 \pm 4.3\%$ no potencial de repouso.

Na realização de uma série de experimentos com músculos papilares de ratos, percebeu-se aquecimento nas proximidades do músculo, tornando-se necessário separar os efeitos puramente térmicos dos efeitos mecânicos. Uma vez que o contato direto de um transdutor de temperatura com o músculo poderia afetar suas propriedades mecânicas, usou-se um método indireto. A temperatura do banho nas proximidades do músculo, mas fora da região diretamente irradiada, foi medida com um termistor, enquanto um termopar de cobre-constantan foi colocado no centro do músculo papilar. Levantados os dados em

graus Celsius para 16 amostras de músculo papilar, a temperatura central do músculo (T_m) foi relacionada à temperatura do banho (T_b) por meio de regressão linear (coeficiente = 0,97), obtendo-se a equação: $T_m = 1,0T_b + 0,4$. Uma limitação da técnica descrita é a incapacidade de detecção de aquecimento de áreas localizadas, principalmente nas interfaces dentro do músculo (MORTIMER *et al.*, 1980).

Músculos papilares de ratos foram irradiados a uma frequência de 2,3MHz, modo contínuo, com intensidades média espacial – média temporal (I_{SATA}) de $1,1W/cm^2$, $2,2W/cm^2$ e $3,3W/cm^2$. Utilizou-se um transdutor piezelétrico feito com uma cerâmica PZT-4 de 13mm de diâmetro e camada de retaguarda de ar. Durante o experimento, os músculos foram expostos a estimulação constante com 3 pulsos/minuto, sendo a duração dos pulsos de 5ms e amplitude 20% acima da requerida para se obter máxima força de contração. Os efeitos do ultrassom nas propriedades mecânicas do músculo foram investigados em função da intensidade da onda ultrassônica. Os parâmetros medidos foram: força em repouso (força diastólica anterior à contração), força desenvolvida (força sistólica máxima), tempo para atingir o pico da força (período entre a estimulação do músculo e a força desenvolvida) e taxa de aumento da força sistólica (dF/dt). Após a exposição ao ultrassom e obtenção de parâmetros mecânicos e de medida indireta da temperatura, procedeu-se a proporcional elevação da temperatura do banho e aquisição de dados correspondentes. Notou-se uma diminuição na tensão diastólica, a qual foi significativamente ($p < 0,05$) diferente da intervenção térmica equivalente, relacionando-se parcialmente o fenômeno à componente não-térmica da energia ultrassônica. Essa componente é definida como a diferença entre a energia ultrassônica total e a resposta térmica equivalente. Os outros parâmetros estudados apresentaram efeitos puramente térmicos (MORTIMER *et al.*, 1980).

Utilizou-se um transdutor piezelétrico com 19mm de diâmetro, retaguarda de ar para excitação contínua, e frequência de ressonância de 963kHz para irradiar músculo papilar de rato à intensidade média espacial – média temporal (I_{SATA}) de $1W/cm^2$, sendo estimulados a taxas de 6, 30, 60, 120 e 360 contrações/minuto, durante 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram força sistólica, força diastólica, temperatura do banho e

intensidade ultrassônica. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na força desenvolvida (em torno de 40%), precedido por uma redução significativa ($p < 0,05$) na força diastólica. Esse aumento na força de contração provocado pela exposição ao ultrassom não pôde ser replicado pela elevação proporcional da temperatura gerada por aquecedores (FORESTER *et al.*, 1982).

Desenvolveu-se um sistema que permitiu avaliar a influência do ultrassom sobre propriedades elétricas da membrana celular e sobre propriedades contráteis de músculo papilar de rato. O ultrassom em modo contínuo (frequência de ressonância de 953kHz e intensidade média espacial – média temporal (I_{SATA}) de $1,5W/cm^2$) acarretou aumento na amplitude do potencial de ação e hiperpolarização do potencial de repouso da membrana. Observou-se, também, uma redução da força em repouso. Essas alterações não ocorreram quando o tecido foi submetido a um aumento de temperatura proporcional à obtida pela presença do campo ultrassônico (MORTIMER *et al.*, 1984).

Estudou-se o efeito de uma breve exposição de 4 segundos ao ultrassom, com frequência de 963kHz e intensidade média espacial – média temporal (I_{SATA}) de $1W/cm^2$, na potencialização pós-tetânica de músculo papilar de rato. Sugeriu-se a existência de uma janela temporal ótima para a observação de aumento na força de contração do miocárdio. A potencialização atingiu o máximo quando a aplicação do ultrassom precedia e persistia até a metade do trem de pulsos potencializador pós-tetânico. Os parâmetros da onda ultrassônica empregados resultaram em um aumento médio de $0,5^{\circ}C$ na temperatura do músculo, podendo apresentar picos espaciais de temperatura 4 a 8 vezes maiores que a temperatura média. É possível que o aquecimento produzido seja confinado a uma fase específica do ciclo cardíaco, produzindo tanto um efeito inotrópico positivo como negativo, dependendo do posicionamento do pulso ultrassônico com relação ao trem de pulsos pós-tetânico (FORESTER *et al.*, 1984).

Utilizando-se um transdutor ultrassônico piezelétrico com diâmetro de 19mm, investigou-se a influência do ultrassom de várias intensidades na contratilidade do músculo papilar isolado de ratos. Os parâmetros da onda ultrassônica aplicados foram: modo de

operação contínuo, frequência de ressonância de 963kHz, intensidades média espacial - média temporal (I_{SATA}) de 0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2W/cm². As amostras de músculo foram estimuladas eletricamente a contrair a 30, 60, 120 e 240 bpm, sendo que a maior sensibilidade muscular ao ultrassom foi observada quando o músculo era estimulado a 240 bpm. Houve decréscimo na força de repouso, enquanto houve um aumento significativo ($p < 0,001$) no pico de força desenvolvida, na taxa de força desenvolvida (dF/dt) e na taxa de relaxamento do miocárdio ($-dF/dt$). Outro parâmetro analisado foi o tempo para atingir o pico da força, o qual aumentou com a exposição ultrassônica, principalmente para altas taxas de estimulação. Admitiu-se que o inotropismo miocárdico esteja linearmente relacionado à intensidade do ultrassom e presumiu-se que não tenha sido provocado por efeitos térmicos (FORESTER *et al.*, 1985).

Em experimentos com músculo papilar isolado de rato, aplicou-se ultrassom contínuo a 543kHz e intensidade média espacial - média temporal (I_{SATA}) de até 3W/cm². Verificou-se despolarização reversível na membrana celular, perda de excitabilidade e aumento de $53,1 \pm 4,3\%$ ($n = 15$) no potencial de repouso com relação à resposta contrátil do grupo controle. O efeito foi atribuído à cavitação, incluindo a correnteza acústica como efeito secundário (ZAKHAROV *et al.*, 1989).

O ultrassom de baixa intensidade ($I_{SAPA} = 500\text{mW/cm}^2$; $I_{SATA} = 100\text{mW/cm}^2$) pode provocar alterações na permeabilidade da membrana e no transporte de íons. O aumento na concentração intracelular de íons cálcio, provocado pelo ultrassom, pode diminuir a permeabilidade de junções do tipo *gap* e, conseqüentemente, desacoplar células. O fato de as células serem capazes de reduzir a concentração intracelular de cálcio, isto é, de bombear o excesso de cálcio para fora do citosol, sugere que as mudanças provocadas pelo ultrassom são reversíveis (DINNO *et al.*, 1989).

Excitaram-se cardiomiócitos isolados de ratos adultos com ultrassom contínuo por 3 minutos, a uma frequência de 10MHz e pressão pico espacial - média temporal (p_{spta}) de 0,15MPa. Não se verificou efeito direto do ultrassom na contração dos miócitos. No entanto, o limiar de excitação elétrica das células expostas ao ultrassom foi reduzido em

aproximadamente 10%. Descartou-se a possibilidade de efeitos térmicos e cavitação. Observou-se que a correnteza acústica tem papel importante na causa de efeitos biológicos *in vitro* provocados pelo ultrassom. Cabe ressaltar que a velocidade da correnteza acústica é maior, uma vez que essa é proporcional ao quadrado da frequência. Talvez por isso os resultados obtidos para 0,15MPa e 10MHz não tenham sido reproduzidos para pressão de 0,3MPa e frequência de 2,25MHz (SALZ *et al.*, 1997).

O desempenho do coração de ratos foi avaliado com base nos seguintes parâmetros contráteis: pressão ventricular esquerda (P_{max}), derivada do aumento e da redução da pressão ventricular esquerda (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) e integral pressão-tempo. A irradiação por 15 minutos com ultrassom em modo contínuo, a 1MHz e $2W/cm^2$, não demonstrou melhorar o desempenho de corações isolados (GREENBERG *et al.*, 2000).

Buscando estabelecer a possibilidade de uso de ultrassom como marca-passo cardíaco, utilizou-se um transdutor de 70kHz, com pulsos de 5ms, frequência de repetição de pulso de 1,4 a 2Hz, ou seja, 84 a 120 bpm (batimentos por minuto), e amplitude de 3MPa para irradiar o miocárdio exposto de porcos. Segundo os autores, os efeitos do ultrassom sobre a atividade elétrica cardíaca parecem ser devidos à força de radiação acústica e possivelmente envolvem a resposta dos miócitos ao estiramento. 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 se estimular o coração, existe uma contribuição adicional de pressão resultante da propagação não-linear (TOWE & RHO, 2006).

Aplicou-se ultrassom de 1MHz, contínuo, durante 1 minuto, focalizado, de alta intensidade ($I_{SATA} = 2,9W/cm^2$) ao ventrículo esquerdo de cobaias Hartley *in vivo*. Quanto à função cardíaca, monitoraram-se a pressão do ventrículo esquerdo, o fluxo sanguíneo na aorta, e a atividade elétrica. Observaram-se efeitos inotrópico e lusitrópico positivos, bem como aumento no fluxo sanguíneo na aorta, sem influência sobre o ritmo cardíaco. Sugeriu-se que o ultrassom pode funcionar na terapia não-farmacológica da insuficiência cardíaca (KUMA *et al.*, 2006)

Campos de litotripsia podem gerar contrações ventriculares prematuras em rãs. Quando um único pulso de litotripsia é gerado durante a fase de diástole do ciclo cardíaco, o limiar de pressão para produzir uma contração prematura é da ordem de 5MPa (DALECKI *et al.*, 1991). Posto que esse limiar é inferior à pressão tipicamente aplicada na prática clínica da litotripsia, os pulsos do equipamento são sincronizados com o pico da onda R do eletrocardiograma para evitar efeitos ao ritmo cardíaco do paciente (DELIUS *et al.*, 1994).

Um pulso com duração de 5ms, frequência de 1,2MHz, e amplitude de 10MPa foi capaz de produzir, em coração de rã, uma contração prematura associada à redução do inotropismo ou prolongamento do relaxamento. O limiar de pressão para ocorrência desse efeito aumentou com a redução da duração do pulso e com a elevação da frequência. Entretanto, o retorno da pressão aórtica a valores normais depois de um ou dois batimentos após a exposição ao ultrassom sugeriu que os componentes contráteis do tecido não foram danificados (DALECKI *et al.*, 1993a).

Um único *burst* de alta intensidade aplicado ao coração de camundongos e rãs *in vivo*, durante a diástole (segmento T-P), pode produzir uma contração prematura (DALECKI *et al.*, 1991; DALECKI *et al.*, 1993a; DALECKI *et al.*, 1993b; DALECKI *et al.*, 1997; MACROBBIE *et al.*, 1997; DALECKI *et al.*, 2005; DALECKI, 2007). Durante a sístole (complexo QRS), um pulso de ultrassom pode levar a uma redução da pressão aórtica desenvolvida (DALECKI *et al.*, 1991; DALECKI *et al.*; 1993b, DALECKI, 2007). Aplicando-se um pulso de 5ms de ultrassom a 1,2MHz, os limiares para a interferência na atividade cardíaca de camundongos e rãs foram, respectivamente, de 2MPa (MACROBBIE *et al.*, 1997) e 5MPa (DALECKI *et al.*, 1993a). Esse limiar cai para frequências mais altas e pulsos mais longos (DALECKI *et al.*, 1993a; DALECKI *et al.*, 1993b), o que não é característico de exposições diagnósticas (DALECKI, 2004; ROTA *et al.*, 2006; DALECKI, 2007).

Entretanto, tecidos que tipicamente não são afetados pela exposição ao ultrassom, podem se tornar suscetíveis quando agentes de contraste estão presentes no

sangue, de forma que contrações prematuras podem resultar de exposições diagnósticas (VAN DER WOUW *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003; DALECKI, 2007). As informações fornecidas pelos fabricantes de agentes de contraste de fato alertam para a possibilidade de efeitos ao ritmo cardíaco, principalmente para altos índices mecânicos e para pulsos ultrassônicos aplicados no final da sístole (DALECKI, 2007).

Um estudo em humanos indicou que contrações ventriculares prematuras podem decorrer de exposições ao ultrassom diagnóstico, na presença de agentes de contraste, com amplitudes correspondentes ao índice mecânico de 1,5 (VAN DER WOUW *et al.*, 2000). Já a aplicação de ultrassom com índice mecânico de 1,4, associado ao uso de agentes de contraste, não causou danos ao miocárdio quando se investigaram variações em indicadores sorológicos (BORGES *et al.*, 2002).

A interação entre ultrassom e agentes de contraste pode produzir sonoporação, aumentando temporariamente a permeabilidade de membrana (O'BRIEN, 2007). Foi demonstrada a ocorrência de danos aos capilares de tecidos musculares esquelético e cardíaco na presença de agentes de contraste (PRICE *et al.*, 1998; MILLER & QUADDUS, 2000; LI *et al.*, 2003). Embora controverso, segundo alguns autores, tais danos podem ser capazes de melhorar o fluxo sanguíneo, pois levaram ao aumento no número e diâmetro de arteríolas (SONG *et al.*, 2002).

Estudos indicam que pode ser reduzido o limiar para a ocorrência de vários efeitos biológicos induzidos pelo ultrassom, como interferência na atividade cardíaca, ruptura capilar, hemólise, trombólise, e até mesmo aumento na permeabilidade da barreira hemato-encefálica. A vulnerabilidade é maior a pressões negativas e a baixas frequências de exposição, o que é compatível com cavitação como mecanismo responsável (DALECKI, 2007).

Implementou-se uma técnica de detecção de cavitação para medir cavitação acústica no coração de camundongos *in vivo*, na presença de agentes de contraste. Para testar se a cavitação acústica está relacionada à produção de contrações prematuras, aplicou-se um pulso de ultrassom de 1ms e frequência de 200kHz durante a diástole. Houve

correlação direta entre a amplitude da saída do detector de cavitação e a tendência à produção de um batimento prematuro. A cavitação inercial foi apontada como mecanismo para a produção de contrações prematuras na presença de agentes de contraste. No grupo controle de camundongos injetados com soro fisiológico, não houve produção de contração prematura, nem houve detecção de cavitação. Por outro lado, em camundongos injetados com agentes de contraste, o ultrassom foi um estímulo efetivo para batimentos prematuros, além de ter sido detectada cavitação (ROTA *et al.*, 2006).

Como o tecido cardíaco responde à estimulação mecânica, investigou-se a força de radiação acústica como possível mecanismo responsável pelos efeitos produzidos pelo ultrassom sobre o coração de rãs. A força de radiação acústica é unidirecional e resulta da transferência de momento do campo acústico para o meio. Um refletor acústico posicionado diretamente sobre o coração de rãs maximizou a força de radiação acústica aplicada ao coração, eliminando a interação direta do ultrassom com o coração, e excluindo o aquecimento e a cavitação como mecanismos responsáveis pelos efeitos observados. A redução da pressão aórtica foi observada, indicando que a força de radiação acústica exercida diretamente sobre o coração seria responsável pelo efeito. Por outro lado, contrações ventriculares prematuras não foram observadas, sugerindo que, para a ocorrência desse efeito, é necessária exposição direta do tecido ao ultrassom. Com o refletor colado ao coração, as forças são aplicadas à superfície frontal, enquanto em exposições diretas, as forças são distribuídas ao longo da profundidade. Se a região sensível ao estímulo estiver dentro do coração, exposições com o refletor serão menos eficientes que as exposições diretas (DALECKI *et al.*, 1997).

Mecanismos puramente térmicos não reproduziram ocorrências provocadas pelo ultrassom no tecido cardíaco (MORTIMER *et al.*, 1980; FORESTER *et al.*, 1982). Experimentos sugerem que o aquecimento não seja o mecanismo primário para a redução da pressão aórtica em corações de rã *in vivo* decorrente da exposição a um único pulso de ultrassom de 5ms. O limiar para a ocorrência desse efeito foi de aproximadamente 5MPa ($I_{SPPA} = 350W/cm^2$) a 10MPa ($I_{SPPA} = 1000W/cm^2$), tanto a 1,2MHz quanto a 3,7MHz. Medições experimentais e estimativas teóricas indicam que, a exposições limiares, as taxas

de aquecimento podem chegar a variar uma ordem de grandeza entre as duas frequências aplicadas. Se o aquecimento fosse diretamente responsável pela redução da pressão aórtica, um maior aquecimento pelo ultrassom de frequência mais alta deveria resultar em uma redução do limiar para ocorrência do efeito (DALECKI *et al.*, 1993b).

CAPÍTULO III

ULTRASSOM

III. 1. DEFINIÇÃO

Ondas ultrassônicas são ondas mecânicas (que dependem de um meio físico para se propagar) com frequência acima de 20kHz. A característica fundamental da onda é que as partículas do meio oscilam, isto é, se deslocam, em torno de suas posições de equilíbrio. Como resultado do deslocamento variável das partículas, a pressão ao longo do meio também se torna variável (KINSLER *et al.*, 1982).

Em fluidos, o deslocamento das partículas se dá principalmente na direção de propagação da onda (longitudinal). Da mesma forma, tecidos moles tendem a ter um módulo de cisalhamento muito baixo, sendo mais significativas as ondas longitudinais. Por outro lado, em materiais elásticos e tecidos como o osso ocorre propagação de ondas de cisalhamento, sendo o deslocamento das partículas ortogonal à direção de propagação da onda (transversal) (HUMPHREY, 2007).

Ao se representar em um gráfico uma onda ultrassônica como uma variação senoidal (excitação contínua), o eixo das abscissas pode ser visto tanto como distância quanto como tempo, sendo a constante que os relaciona a velocidade de propagação da onda ($c = \lambda f$). As cristas e vales da onda ultrassônica correspondem, respectivamente, aos picos de compressão e de rarefação. O intervalo entre duas cristas ou entre dois vales é chamado, no espaço, de comprimento de onda (λ), e no tempo, de período (T). O período é o inverso da frequência ($f = 1/T$). O ciclo de trabalho (CT) é a razão entre a duração do pulso (τ) e o período de repetição do pulso (PRP). O ciclo de trabalho reflete a fração de tempo em que o transdutor está em funcionamento (O'BRIEN, 2007).

As ondas ultrassônicas transportam energia na forma de energia cinética (movimento das partículas) e energia potencial (compressão do fluido) (HUMPHREY,

2007). Assim, a amplitude da onda pode representar tanto o deslocamento das partículas, quanto a pressão gerada por esse deslocamento.

De acordo com a teoria acústica linear, durante a propagação de uma onda mecânica longitudinal em um fluido, as partículas do meio se movem para frente e para trás em torno da posição de equilíbrio. Esse comportamento pode ser observado para ondas acústicas de baixa intensidade. Isso significa que a propagação linear de uma onda mecânica não transfere massa. Ou seja, o transporte de energia por uma onda ultrassônica é associado ao fluxo de momento linear (dQ/dt) através do plano normal (A) ao feixe ultrassônico (Eq. 3.1):

$$\frac{dQ/dt}{A} = \frac{m \cdot dv/dt}{A} = \frac{m \cdot a}{A} = \frac{F}{A} = p, \quad (3.1)$$

onde m é a massa da partícula, v é a velocidade da partícula, t é tempo, a é a aceleração da partícula, F é a força de radiação e p é a pressão acústica (WELLS, 1977).

Assumindo-se que a propagação da onda seja um processo linear, a onda viaja com velocidade constante c_0 e sua forma não é alterada. Entretanto, se a amplitude da onda for suficientemente alta e a dissipação for suficientemente baixa, não-linearidades inerentes à propagação podem aparecer (LEIGHTON, 2007). Nesse caso, quando uma onda acústica inicialmente senoidal de frequência f se propaga num determinado meio, há transferência de energia do modo fundamental f para os harmônicos superiores ($2f$, $3f$, $4f$ etc.), causando uma distorção na forma de onda (DUCK, 2002). A velocidade de propagação da onda nas regiões de pressão se torna maior que nas regiões de rarefação, criando variações rápidas da pressão com a distância (FISH, 1994).

III. 2. MECANISMOS QUE ACARRETAM EFEITOS BIOLÓGICOS

O avanço do ultrassom aplicado à medicina requer um melhor conhecimento de mecanismos físicos que acarretam efeitos biológicos (DALECKI, 2004). Os efeitos

provocados pela interação da onda ultrassônica com tecidos biológicos podem ser classificados como térmicos e não-térmicos. Ao contrário dos térmicos, os não-térmicos são aqueles que primariamente não geram aquecimento, podendo resultar de vários mecanismos físicos relacionados à propagação.

À medida que se propaga, principalmente devido à absorção da energia, o ultrassom causa aquecimento (ΔT) nos tecidos biológicos (Eq. 3.2).

$$\Delta T = (I \cdot \alpha \cdot \Delta t) / (\rho \cdot c), \quad (3.2)$$

onde I é a intensidade da onda ultrassônica, Δt é a duração da exposição, α é o coeficiente de atenuação, ρ é a densidade e c é o calor específico (energia requerida para elevar em 1°C a temperatura de 1g de tecido).

Entretanto, um aumento de temperatura só será observado se a taxa de aquecimento for maior que a taxa de resfriamento. O aquecimento é, portanto, o resultado do balanço entre ganho de calor e perda de calor. A resposta fisiológica a efeitos térmicos compreende aumento do fluxo sanguíneo, aceleração do metabolismo tecidual (BAKER *et al.*, 2001), aumento da permeabilidade de membranas e alterações nos potenciais de membrana (ROBINSON & BUONO, 1995).

Cavitação é um termo usado para descrever uma série de fenômenos complexos, envolvendo a criação, oscilação, crescimento e colapso de bolhas em um meio (LEIGHTON, 1997). Dependendo da frequência, amplitude da onda de pressão, raio da bolha, e ambiente ao seu redor, o comportamento da cavitação pode ser classificado como não-inercial ou inercial.

O índice mecânico é um indicador da tendência para ocorrência de cavitação (Eq. 3.3):

$$IM = p_r / \sqrt{f}, \quad (3.3)$$

onde p_r é o pico negativo de pressão (rarefação) e f é a frequência de ressonância do ultrassom (HUMPHREY, 2007). O limite do índice mecânico estipulado para equipamentos de ultrassom diagnóstico é de 1,9, com exceção de aplicações oftálmicas, para as quais o índice não deve passar de 0,23 (FDA, 1997). Para se observar o comportamento da cavitação acústica, podem-se utilizar sensores piezelétricos que medem variação de pressão em alta frequência, como o desenvolvido pelo *National Physical Laboratory (NPL)* (ZEQIRI *et al.*, 2003).

Microbolhas passando por cavitação acústica atuam com fontes secundárias de ultrassom. Ainda que seja capaz de aumentar a temperatura dos tecidos, a cavitação é tradicionalmente conhecida como um mecanismo não térmico (O'BRIEN, 2007).

Na cavitação não-inercial, que ocorre a baixas intensidades, o espectro de emissões acústicas provenientes de oscilações não-lineares de microbolhas (naturalmente existentes ou não no tecido biológico) inclui harmônicos, ultra-harmônicos e sub-harmônicos da frequência da onda ultrassônica (LEIGHTON, 1997). As bolhas crescem gradualmente e, uma vez atingido um tamanho crítico, a microcorrenteza acústica que se instala é capaz de criar regiões localizadas de alta tensão de cisalhamento, fragmentando inclusive estruturas subcelulares (CANNON, 2001).

As emissões acústicas provenientes de microbolhas passando por cavitação inercial são caracterizadas por um espectro de banda larga, com ruído branco, atribuído ao violento colapso das bolhas (LEIGHTON, 1997). Na cavitação inercial, o colapso de bolhas libera uma grande quantidade de energia num curto intervalo de tempo (WELLS, 1977), podendo causar superaquecimento, formação de radicais livres e moléculas tóxicas, acarretando deterioração estrutural e funcional celular, incluindo sobrecarga de cálcio (GREENBERG *et al.*, 2000; ZACHARY *et al.*, 2002). Por outro lado, o aumento da permeabilidade da membrana aumenta a difusão de nutrientes e oxigênio (GREENBERG *et al.*, 2000).

Mantendo-se uma mesma intensidade, o acontecimento de efeitos térmicos é diretamente proporcional à frequência do ultrassom, enquanto a possibilidade de ocorrência

de cavitação é maior a frequências mais baixas (BAILEY *et al.*, 2003). Todavia, não se deve assumir que apenas um efeito provocado pelo ultrassom está presente em um dado instante. Nem se deve associar modo contínuo com efeitos térmicos e modo pulsado com efeitos não térmicos. O modo pulsado simplesmente minimiza o aumento de temperatura proporcionalmente ao período de repetição do pulso. Entretanto, o aquecimento não é eliminado (BAKER *et al.*, 2001).

Além do aquecimento e cavitação, há efeitos secundários que podem ser gerados pelo campo ultrassônico. Tais efeitos apresentam potencial para produção de forças e movimentos a frequências muito mais baixas do que as das ondas incidentes. São eles: pressão de radiação acústica e correnteza acústica (HUMPHREY, 2007).

A pressão de radiação é uma pequena pressão contínua (para excitação contínua), que atua na direção de propagação da onda ultrassônica, exercida em superfícies ou interfaces entre meios (HUMPHREY, 2007). Sua magnitude é proporcional à intensidade média-temporal local (O'BRIEN, 2007). No caso de absorção completa de um feixe finito de ondas planas, a força de radiação acústica (F) é dada por (Eq. 3.4):

$$F = W/c, \quad (3.4)$$

onde W é a potência ultrassônica, e c é a velocidade de propagação do ultrassom. Se a incidência for normal, a força em um refletor perfeito é igual a duas vezes a força em um absorvedor perfeito (WELLS, 1977).

À medida que aumenta a amplitude da onda, as partículas deixam de apresentar somente comportamento oscilatório e começa a ocorrer escoamento do fluido. Esse efeito não-linear é chamado de correnteza acústica (FISH, 1994), sendo a velocidade do fluxo proporcional ao quadrado da frequência de ressonância do ultrassom (SALZ *et al.*, 1997). A atenuação do feixe ultrassônico com a distância gera um gradiente de pressão de radiação no fluido, de forma que cada partícula do fluido recebe uma força resultante, o que gera o fluxo (HUMPHREY, 2007).

A literatura sobre a aplicação do ultrassom no tecido cardíaco aponta prováveis efeitos não-térmicos (FORESTER *et al.*, 1982; MORTIMER *et al.*, 1984; FORESTER *et al.*, 1985; ZAKHAROV *et al.*, 1989; KUMA *et al.*, 2006). A correnteza acústica tem papel importante na causa de efeitos biológicos *in vitro* provocados pelo ultrassom (SALZ *et al.*, 1997), alterando a permeabilidade (MORTIMER & DYSON, 1988; DINNO *et al.*, 1989; HASSON *et al.*, 1990) e aumentando o gradiente iônico através da membrana (POHL *et al.*, 1993). Os efeitos do ultrassom na atividade elétrica cardíaca foram descritos como sendo devidos à força de radiação acústica e uma manifestação da sensibilidade do miócito ao estiramento (TOWE & RHO, 2006).

III. 3. CONSIDERAÇÕES SOBRE INTENSIDADES

A ausência de padronização no que diz respeito às amplitudes aplicadas nos experimentos relatados na literatura dificulta a análise comparativa dos resultados. As amplitudes podem ser dadas em pressão (MPa) ou em intensidade (W/cm^2), havendo ainda a subdivisão de intensidades em pico e média espacial e/ou temporal:

- I_{SP} (*spatial peak*): intensidade pico espacial;
- I_{SPTP} (*spatial peak-temporal peak*): intensidade pico espacial – pico temporal;
- I_{SPTA} (*spatial peak-temporal average*): intensidade pico espacial – média temporal;
- I_{SPPA} (*spatial peak-pulse average*): intensidade pico espacial – média no pulso;
- I_{SA} (*spatial average*): intensidade média espacial;
- I_{SATP} (*spatial average-temporal peak*): intensidade média espacial – pico temporal;
- I_{SATA} (*spatial average-temporal average*): intensidade média espacial–média temporal;
- I_{SAPA} (*spatial average-pulse average*): intensidade média espacial – média no pulso.

Quando um feixe ultrassônico gerado por excitação contínua é registrado por um hidrofone pontual posicionado no ponto focal, tem-se uma onda cujo pico é o maior de todo o campo (intensidade pico espacial – I_{SP}). No caso do ultrassom pulsado, o pico do pulso é a intensidade pico espacial – pico temporal (I_{SPTP}). Isso porque nesse caso, a onda

varia não só no espaço, como também no tempo. Assim, pode-se calcular a média temporal, considerando o período de repetição do pulso (intensidade pico espacial – média temporal, I_{SPTA}) ou o período do pulso (intensidade pico espacial – média no pulso, I_{SPPA}).

Vários hidrofones idênticos, de ambos os lados do primeiro hidrofone já citado, registram sinais temporais decorrentes de excitação contínua. O pico do sinal temporal ocorrerá para cada um deles ao mesmo tempo. Fazendo-se a média dos valores dos picos (média espacial), tem-se a intensidade média espacial (I_{SA}). Lembra-se que, para o ultrassom pulsado, há uma variação temporal no sinal detectado, sendo o maior pico a intensidade média espacial – pico temporal (I_{SATP}).

Considerando-se o sinal detectado por cada hidrofone, pode-se fazer a média temporal dos mesmos, tanto se considerando o período de repetição do pulso, quanto o período do pulso (I_{SPTA} e I_{SPPA} , respectivamente). Com o valor médio temporal de intensidade para cada hidrofone, tira-se a média espacial. Assim, tem-se a intensidade média espacial – média temporal (I_{SATA}) e intensidade média espacial – média no pulso (I_{SAPA}).

As intensidades mais relacionadas a efeitos térmicos são as médias temporais. Por outro lado, efeitos não-lineares dependem de pulsos de alta pressão, sendo de interesse o pico de pressão negativa (rarefação) e a intensidade I_{SPTP} (FISH, 1990).

Quando se tem o campo quantificado em pressão, considerando-se a onda plana e a excitação harmônica, pode-se calcular a intensidade média temporal (I_{TA}) em um ponto do campo pela Eq. 3.5:

$$I_{TA}(x, y) = \frac{p^2(x, y)}{2\rho c}, \quad (3.5)$$

onde p é a pressão, ρ é a densidade do meio, e c é a velocidade de propagação do ultrassom no meio. A intensidade pico espacial média temporal (I_{SPTA}) se dará no ponto em que for o

pico espacial do campo acústico. Pode-se calcular a média espacial (I_{SATA}) do campo usando-se a Eq. 3.6:

$$I_{SATA} = \frac{I}{A} \int_A I_{TA}(x, y) dA, \quad (3.6)$$

onde A é a área da região considerada para cálculo da média espacial (KINSLER *et al.*, 1982).

CAPÍTULO IV

O CORAÇÃO

IV. 1. ATIVIDADE CARDÍACA

O sistema de geração e condução de atividade elétrica do coração coordena a função de bombeamento. O marca-passo natural do coração é o nó sinoatrial, uma pequena área de tecido especializado no átrio direito, onde se inicia o sinal elétrico. O sinal elétrico então é conduzido para os átrios levando-os a contrair, chega ao nó atrioventricular, localizado entre os átrios e os ventrículos, continua a ser propagado através do feixe de His que se divide em ramos direito e esquerdo e, em seguida, através das fibras de Purkinje, que conduzem a atividade elétrica para as fibras musculares dos ventrículos. Como resultado da excitação elétrica, o músculo se contrai e as câmaras bombeiam o sangue (BERNE *et al.*, 2003).

O desenvolvimento do pulso de excitação elétrica (potencial de ação) decorre do gradiente eletroquímico de diferentes íons que existe através da membrana de cada miócito. Em repouso, a membrana é seletivamente permeável a íons K^+ , e o potencial elétrico no interior do miócito é negativo com relação ao exterior, próximo ao potencial eletroquímico deste íon. Durante a excitação elétrica, a membrana se torna permeável ao Na^+ , cujo potencial de equilíbrio é positivo, e a membrana é despolarizada. Íons Ca^{2+} entram nas células, levando, no retículo sarcoplasmático, à chamada liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . O aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} é responsável por desencadear a contração em cada célula. Quando a concentração citoplasmática de Ca^{2+} é reduzida, as células relaxam (MARBAN, 2002).

A despolarização da membrana é mediada por canais que permitem a entrada de cátions (Na^+ , Ca^{2+}) no miócito, ou ainda a saída de ânions (Cl^-). O contrário ocorre durante a repolarização. Quando há abertura de canais, o potencial de membrana tende para aquele

que corresponde ao equilíbrio do íon ao qual a membrana tem maior condutância, o que se dá pelo movimento passivo dos íons através da membrana. A abertura de canais de K^+ tende a levar o potencial para -90mV devido à saída de K^+ da célula; por outro lado, a abertura de canais de Na^+ ou Ca^{2+} leva o potencial para níveis positivos ($+40\text{mV}$ ou maior) devido à entrada desses íons na célula. O sinal elétrico resultante é conhecido como potencial de ação. O gradiente iônico é mantido basicamente pela permeabilidade iônica seletiva da membrana e por processos em que há gasto de energia, como a ATPase de Na^+/K^+ (MARBAN, 2002).

Algumas doenças cardiovasculares tipicamente acarretam a formação de tecido cicatricial, o qual interfere na condução elétrica normal do coração, tornando assim um indivíduo propenso ao desenvolvimento de arritmias. Neste caso, eventos como estimulação adrenérgica, isquemia do miocárdio, uma mudança na tensão da parede devido ao estiramento, ou a administração de uma droga podem desencadear uma arritmia (KNOLLMANN & RODEN, 2008).

IV. 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE ARRITMIAS

O coração pode acelerar ou desacelerar em diversas condições. Estas palpitações são quase sempre transitórias e sem maior importância. No entanto, o mau funcionamento do sistema elétrico do coração, ou mesmo dos miócitos, pode resultar em graves distúrbios de ritmo, as arritmias.

Quando o nó sinoatrial não consegue gerar impulsos numa frequência adequada, ou a transmissão é bloqueada em alguma parte do sistema elétrico, o ritmo cardíaco pode se tornar anormalmente lento. Assumindo que esta bradicardia não é efeito colateral de uma medicação ou produzida por alguma outra condição reversível, a causa mais provável é a doença do nó sinoatrial, nó atrioventricular, ou alguma outra parte da via de condução. Se o paciente for sintomático e a frequência cardíaca for extremamente baixa

(abaixo de 45 bpm), a condição pode melhorar com um marca-passo artificial (BRATSFORD, 1992).

Normalmente, as células do coração que disparam com maior frequência estão no nó sinoatrial, tornando essa área um marca-passo natural. No entanto, há marca-passos secundários em outras partes do coração que fazem o papel do marca-passo primário, em caso de falha da função sinusal ou quando os impulsos forem bloqueados em algum lugar do sistema de condução. Sob certas condições, quase todos os tecidos do coração podem iniciar um impulso capaz de gerar um batimento cardíaco. Esta atividade pode prejudicar a função normal de bombeamento do coração.

Na fibrilação atrial, a contração desordenada dos átrios não permite o bombeamento adequado do sangue para os ventrículos, podendo resultar na formação de trombos nas câmaras superiores do coração. Se um trombo se soltar dos átrios, ele pode entrar na circulação e se alojar em uma artéria estreita, como as do cérebro, causando um acidente vascular cerebral.

Durante a fibrilação ventricular, múltiplos circuitos reentrantes tornam a excitação descoordenada, ocorrendo contração assíncrona de regiões individuais do ventrículo, o que resulta em uma incapacidade de bombeamento. Essa total falta de ritmo pode resultar em parada cardíaca, que pode ser fatal em poucos minutos se não houver uma intervenção de emergência (BERNE *et al.*, 2003).

A ocorrência de arritmia pode levar a um processo de remodelação que aumenta ainda mais a tendência à arritmia (KNOLLMANN & RODEN, 2008). A fibrilação atrial é capaz de remodelar o átrio, aumentando a susceptibilidade à fibrilação atrial após o término da estimulação (WIJFFELS *et al.*, 1995). Altas frequências ventriculares também podem remodelar o ventrículo, causar diminuição da função contrátil e aumento da susceptibilidade a arritmias (NERHEIM *et al.*, 2004). Técnicas eficazes de prevenção para tratar fibrilação atrial e ventricular, que são formas comuns e graves de arritmia, ainda não foram desenvolvidas (KNOLLMANN & RODEN, 2008).

IV. 3. TRATAMENTOS DISPONÍVEIS PARA ARRITMIAS

Os tratamentos disponíveis para arritmias são limitados tanto pela baixa eficácia quanto por graves efeitos colaterais (MARBAN, 2002). Embora os efeitos adversos sejam um risco de todos os medicamentos, os associados a drogas antiarrítmicas podem ser extremamente difíceis de lidar. Paradoxalmente, um deles é a pró-arritmia, ou seja, potencial para gerar novas arritmias potencialmente fatais (NATTEL, 1998). Assim, buscam-se terapias não-farmacológicas para arritmias cardíacas (NATTEL, 2002).

IV. 3. 1. Ablação por radiofrequência

A ablação por radiofrequência se aplica a alguns tipos de arritmia, mas dificilmente resulta em benefício em taquicardias atriais e ventriculares (MARBAN, 2002).

Outra limitação dessa técnica é a necessidade de contato direto com o tecido a ser necrosado. A ponta do catéter torna-se um obstáculo para a visualização concomitante da anatomia da região (WONG *et al.*, 2006). Uma alternativa que vem sendo investigada é a aplicação de ultrassom focalizado de alta intensidade para a ablação, já que neste caso o transdutor de ultrassom não necessita estar em contato direto com o tecido a ser necrosado (DENG *et al.*, 2005).

IV. 3. 1. Estimulação elétrica

O tratamento elétrico de arritmias pode ser realizado por cardioversão, desfibrilação, ou ainda pelo uso de marca-passos. Os dispositivos elétricos podem, ainda, ser divididos em temporários, usados em hospitais e em cuidados de emergência, e implantáveis.

A cardioversão é usada em pacientes sedados para o tratamento de taquicardias supraventriculares, quando o choque aplicado pode ser sincronizado com o ciclo cardíaco.

A desfibrilação é geralmente usada em pacientes inconscientes, aplicando-se um choque não sincronizado, geralmente maior que o usado na cardioversão, o que é feito em casos de ritmos caóticos, como a taquicardia ventricular e a fibrilação ventricular. A descarga de um desfibrilador-cardioversor visa a despolarização da membrana da maioria das células cardíacas, de forma que o coração possa gerar impulsos elétricos normais e voltar a contrair normalmente (BRATSFORD, 1992).

Desfibriladores cardioversores implantáveis são muito úteis para reverter taquicardias ameaçadoras à vida (KNOLLMANN & RODEN, 2008). Para isso, é necessário um choque de no mínimo 10 a 15J, mas a maioria dos dispositivos chega a entregar 30J para permitir uma margem de segurança (BRATSFORD, 1992). No entanto, as descargas são dolorosas (REDDY *et al.*, 2007) e não oferecem proteção completa contra a morte por arritmia (ANDERSON, 2005), já que esses dispositivos podem falhar em estimular quando necessário (GRAHAM-ROWE, 2005). Além disso, as altas intensidades dos campos elétricos gerados durante a desfibrilação podem causar eletroporação e morte celular (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Além de fornecer choques de alta energia para terminar uma taquicardia ventricular, fibrilação ventricular ou assistolia, desfibriladores implantáveis frequentemente agem como marca-passos (GRAHAM-ROWE, 2005), complementando a desfibrilação com outros modos de reversão de taquicardia (BRATSFORD, 1992).

A estimulação antitaquicardia é uma técnica indolor que pode ser utilizada para terminar uma taquiarritmia ventricular, antes que se transforme em fibrilação ventricular. Tal estimulação é feita através do envio de breves impulsos ao coração a uma taxa mais alta do que a já acelerada frequência ventricular. As taxas da estimulação antitaquicardia podem ser cuidadosamente programadas para ser apenas 1% mais altas que as taxas ventriculares. O objetivo é despolarizar o músculo do coração no momento certo, interrompendo o ritmo anormal. No entanto, quando, na taquicardia ventricular, a frequência é superior a 200 bpm, a estimulação antitaquicardia não é benéfica, pois pode converter uma taquiarritmia estável em fibrilação ventricular, exigindo, portanto, choques desfibrilatórios. Assim, quando a taxa ultrapassar 200 bpm, outros tratamentos antiarrítmicos podem ser usados para reduzir

parcialmente a alta frequência cardíaca, e permitir o uso da manobra elétrica antitaquicardia (BRATSFORD, 1992; TROHMAN, *et al.*, 2004).

O marca-passo artificial trabalha para manter uma mínima frequência cardíaca que seja segura, entregando impulsos elétricos devidamente cronometrados ao coração. O marca-passo apenas acelera o ritmo cardíaco, sendo usado para bradiarritmias. Ele não diminui diretamente uma frequência cardíaca alta; no entanto, isso pode ser feito indiretamente através da estimulação antitaquicardia (BRATSFORD, 1992; GRAHAM-ROWE, 2005).

Outro problema no que se refere aos dispositivos elétricos implantáveis é o uso de cabos-eletrodos, necessários para emitir pulsos de energia para estimular o miocárdio. As falhas ocorrem tanto durante o implante, como também anos mais tarde (LEE, 2010), e são encontradas em todos os modelos, desde os mais antigos até as versões mais recentes (KLEEMANN *et al.*, 2007). A incidência de problemas é significativamente maior em dispositivos de câmara tripla do que em sistemas de câmara única e dupla (DURAY *et al.*, 2009). As complicações incluem infecção sistêmica (KUTALEK, 2004; SOHAIL *et al.*, 2007), pericardite (ELLENBOGEN *et al.*, 2002), perfuração miocárdica (BIGDELI *et al.*, 2010), estimulação desnecessária (GRAHAM-ROWE, 2005), potencial de pró-arritmia (TUNG *et al.*, 2008), falha em estimular, e até mesmo a morte (MAISEL, 2008). Mesmo cabos-eletrodos indesejados, mas não infectados, que geralmente são abandonados, podem resultar em migração, erosão da pele, trombose venosa, e estimulação muscular (BÖHM *et al.*, 2001). A extração de cabo-eletrodo que tenha sido implantado há muito tempo é um procedimento de alto risco (TROHMAN *et al.*, 2004;. KUTALEK, 2004), mas muitas vezes necessário (BARDY *et al.*, 2010).

IV. 3. 1. Estimulação mecânica

Sabe-se que o coração pode ser afetado por distúrbios mecânicos, que influenciam a origem e a propagação da excitação elétrica do coração através de

mecanismos intrínsecos ou extrínsecos. Esse processo é chamado de retroalimentação mecano-elétrica e é envolvido em uma variedade de manifestações clínicas. Afeta a modulação fisiológica da frequência cardíaca, a indução mecânica (por exemplo, *commotio cordis*) e a reversão (por exemplo, percussão precordial) de distúrbios do ritmo cardíaco. Esse mecanismo envolve canais iônicos mecanossensíveis e modulação mecânica da homeostasia celular de Ca^{2+} (KOHL *et al.*, 1999; KOHL & SACHS, 2001).

Commotio cordis é uma condição em que o coração é estimulado mecanicamente por uma pancada, um impacto não penetrante no peito, produzindo distúrbios no ritmo cardíaco, inclusive morte súbita. Os fatores determinantes do *commotio cordis* são a localização da pancada, que deve ser diretamente sobre o coração, e o momento da pancada, que deve ocorrer dentro de uma estreita janela de 10 a 20ms, na subida da onda T (o que corresponde a 1% do ciclo cardíaco). A ausência de danos estruturais às costelas, ao esterno ou ao coração diferencia o *commotio cordis* de uma contusão cardíaca, em que pancadas de alto-impacto causam danos traumáticos ao tecido cardíaco e ao tórax (NESBITT *et al.*, 2001; MARON & ESTES, 2010).

A estimulação mecânica transtorácica é um procedimento antigo usado para salvar a vida até que um dispositivo elétrico esteja disponível. O punho fechado é usado para golpear a borda inferior esquerda do esterno. A estimulação mecânica é baseada na capacidade do coração de disparar um impulso elétrico em resposta a um estímulo mecânico, um fenômeno que é clinicamente bem conhecido devido à estimulação do coração por manipulação cirúrgica ou por catéter. Em pacientes bradiarrítmicos, a percussão pode ser realizada usando-se o punho fechado para golpear o tórax em uma frequência de 50-70 bpm. O punho fechado deve cair a partir de uma distância de 20-30cm do tórax, resultando em um aumento de 10-15mmHg na pressão ventricular, que é capaz de induzir atividade elétrica (EICH *et al.*, 2005; EICH *et al.*, 2007).

Em caso de parada cardíaca testemunhada, um único golpe (batida precordial) pode produzir alguns joules e, por isso, tem o potencial de promover desfibrilação (PELLIS *et al.*, 2009; EISENBERG & MENGERT, 2001). Acredita-se que a energia mecânica

gerada pela batida precordial aumenta a pressão intracavitária do ventrículo esquerdo instantaneamente para 250-450mmHg. Esse aumento de pressão leva ao estiramento das membranas celulares, o que aumenta o fluxo de corrente transmembrana através de uma conexão mecano-elétrica (MARON & ESTES, 2010).

CAPÍTULO V

TRANSDUTORES ULTRASSÔNICOS DE POTÊNCIA

Conforme exposto no capítulo IV, o coração pode ser afetado por estímulos mecânicos, de forma que o ultrassom, por ser uma onda mecânica, tem potencial para interferir na atividade cardíaca. Transdutores ultrassônicos de alta potência, capazes de gerar campos acústicos de alta intensidade, têm maior probabilidade de produzir efeitos sobre a atividade cardíaca.

O transdutor ultrassônico, seja de frequência na ordem de kHz ou MHz, pode ser acoplado a um amplificador mecânico, o qual atua como concentrador de energia. Para aplicação em alta potência, as cerâmicas piezelétricas devem apresentar alto acoplamento eletromecânico, alto ponto de Curie, baixas perdas dielétricas quando submetidas à alta tensão, e propriedades estáveis ao longo do tempo e sob altas temperaturas. Assim, utilizam-se as cerâmicas de titanato zirconato de chumbo (PZT) tipos 4 e 8 (GALLEGO-JUÁREZ, 1989).

Quando se pretende que o transdutor opere na faixa de kHz, este pode ser montado como Langevin (HEIKOLLA & LAITINEN, 2005). Transdutores do tipo Langevin são formados por um sanduíche de cerâmicas piezelétricas empilhadas, pré-tensionadas por um parafuso de alta resistência mecânica, entre duas massas metálicas. Esses elementos são projetados para funcionarem como ressonadores de meio comprimento de onda, vibrando com as faces em contra-fase, gerando altos deslocamentos nas pontas e deslocamento nulo no centro. O valor da frequência de ressonância depende das dimensões e características acústicas das cerâmicas e das massas metálicas.

As cerâmicas piezelétricas são polarizadas na direção longitudinal e montadas com sentidos de polarização alternados, possibilitando a ligação em paralelo, o que diminui a impedância elétrica do transdutor (GALLEGO-JUÁREZ, 1989). O empilhamento reduz a

tensão elétrica de acionamento, quando comparada à tensão necessária para acionar um único elemento de dimensões equivalentes (DUBBUS *et al.*, 2002).

A aplicação da pré-tensão mecânica evita a degradação das cerâmicas durante a operação (ARNOLD & MUHLEN, 2001), já que estas apresentam maior resistência à compressão do que à tração (DUBBUS *et al.* 1991). As massas metálicas atuam como linhas de transmissão, transferindo energia para o meio. Além disso, auxiliam a dissipação térmica e favorecem a distribuição da pré-tensão nas superfícies das cerâmicas (HEIKOLLA & LAITINEN, 2005).

Foram modelados, construídos e caracterizados 6 transdutores, tendo sido numerados de T1 a T6 (respectivamente, 1MHz, 50,7kHz, 65,7kHz, 54,8kHz, 44,2kHz e 102kHz). Além desses, também foi utilizado um transdutor de fisioterapia (TA), montado pelo grupo do Laboratório de Ultrassom do Departamento de Engenharia Mecatrônica da Escola Politécnica da USP. Dessa forma, foram estudados, no total, sete transdutores com variadas geometrias e frequências de ressonância.

A seleção das frequências de ressonância foi feita de forma que fossem testadas as de 1MHz e as em torno de 50kHz e 100kHz. Os transdutores T3 e T5 foram inicialmente modelados para operarem em torno de 100kHz, o que não ocorreu. O T3 inicialmente operava a 100kHz, mas sofreu aquecimento e deixou de operar nessa frequência, passando a operar a 65,7kHz. O T5 (44,2kHz) nunca chegou a operar a 100 kHz, e não está descrito neste trabalho pois houve fratura das cerâmicas e o mesmo não chegou a ser aplicado em animais (nem mesmo preliminarmente). T3 e T5 tinham comprimentos de múltiplos de número par de $\lambda/2$. Para modificar o projeto, T6 teve comprimento de $3 \lambda/2$.

Quanto à geometria, a principal diferença entre os dois transdutores de 1MHz é a presença de um amplificador mecânico no T1, enquanto não há amplificador no TA. Os outros transdutores foram montados como Langevin, sendo que T2, T3 e T6 possuem amplificadores mecânicos, ao contrário de T4 e T5.

V. 1. MODELAGEM

A modelagem clássica unidimensional descreve apenas as vibrações em modo de espessura, desprezando os modos laterais, o que pode ser feito apenas quando as dimensões laterais do transdutor são menores que um quarto de comprimento de onda. Quando as dimensões laterais excedem um quarto de comprimento de onda, uma abordagem tridimensional é necessária (IULA *et al.*, 2002). Assim, a modelagem foi realizada por meio do Método dos Elementos Finitos (MEF), utilizando-se o ANSYS/Multiphysics.

O MEF é um método numérico genérico para solução de equações diferenciais parciais com condições de contorno que descrevem problemas de engenharia envolvendo análise de tensões, piezeletricidade, eletromagnetismo, transferência de calor, comportamento de fluidos, etc. O MEF subdivide uma estrutura com geometria qualquer em um certo número de elementos de forma mais simples, gerando uma malha de elementos. Para cada elemento, as equações diferenciais são resolvidas, chegando-se a uma solução para o problema como um todo.

A análise por elementos finitos pode ser dividida em três etapas: pré-processamento, solução e pós-processamento. Durante o pré-processamento, define-se o problema, por meio da determinação da geometria, das propriedades do material, do tipo de elemento (no caso, *PLANE13* para piezelétrico e *PLANE42* para estrutural), das dimensões do elemento (no caso, $\lambda/20$) que serão aplicadas para gerar a malha do transdutor, e das condições de contorno e carregamento. Ao proceder à solução, o *software* resolve um conjunto de equações para se obter as soluções nodais (por exemplo, para estruturas, deslocamentos e tensão mecânica, e para elementos piezelétricos, deslocamentos, tensões mecânicas e cargas elétricas). Na última etapa, pós-processamento, podem-se visualizar resultados como distribuição das tensões mecânicas ou deslocamentos, no caso de estruturas mecânicas, ou a distribuição de potencial elétrico, no caso de materiais piezelétricos (ANSYS, 2007).

Dada a simetria axial dos transdutores, optou-se pelo uso de modelos axissimétricos. As representações esquemáticas dos transdutores, bem como as soluções nodais para os deslocamentos por eles produzidos na direção axial (U_y), são apresentadas nas Figuras 5.1 a 5.10.

O transdutor T1 (Fig. 5.1) concentra a energia em direção à ponta do amplificador (Fig. 5.2). No entanto, há muitas regiões de deslocamentos máximos e mínimos devido a sua extensão (mais de 30 meios comprimentos de onda). O amplificador mecânico do T1 poderia ter sido construído com menos 12mm em sua ponta, o que aumentaria o deslocamento produzido. Contudo, no momento da construção, havia a ideia de se introduzir o transdutor por cima do recipiente contendo o coração, sendo necessária uma ponta fina. Se essa ponta fina fosse removida, a transmissão de energia seria maior.

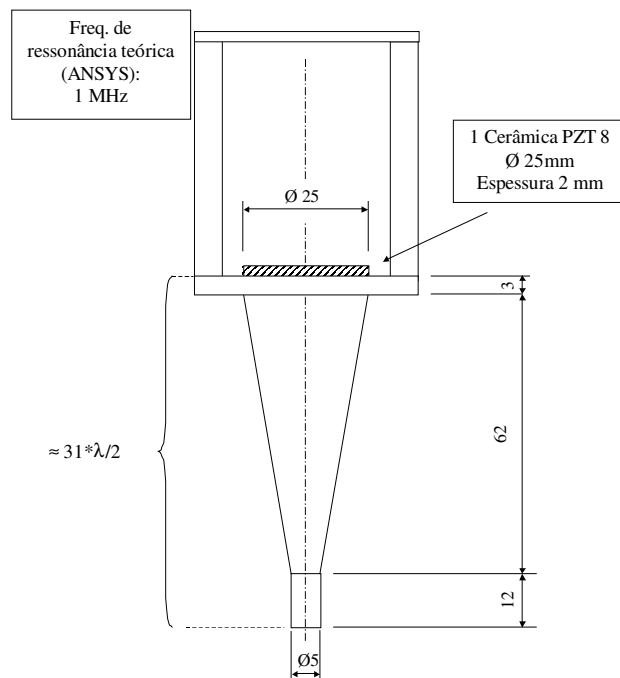


Fig. 5.1 – Representação esquemática do transdutor T1.

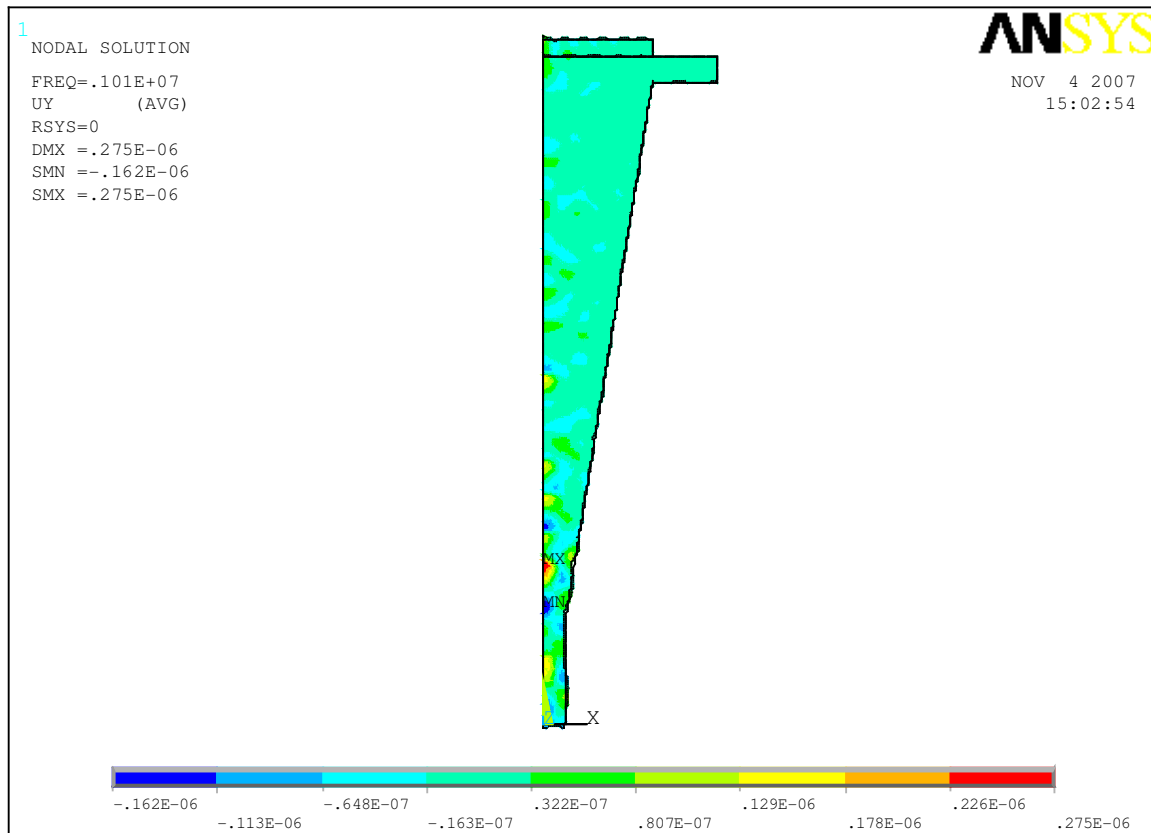


Fig. 5.2 – ANSYS: Deslocamentos U_y do T1 (modelo axissimétrico).

Para os transdutores T2 (Fig. 5.3), T3 (Fig. 5.5), T4 (Fig. 5.7) e T6 (Fig. 5.9), ocorre deslocamento máximo na ponta do amplificador mecânico e deslocamento mínimo em regiões de $\lambda/4$, por onde o transdutor pode ser fixado (Fig. 5.4, 5.6, 5.8 e 5.10, respectivamente).

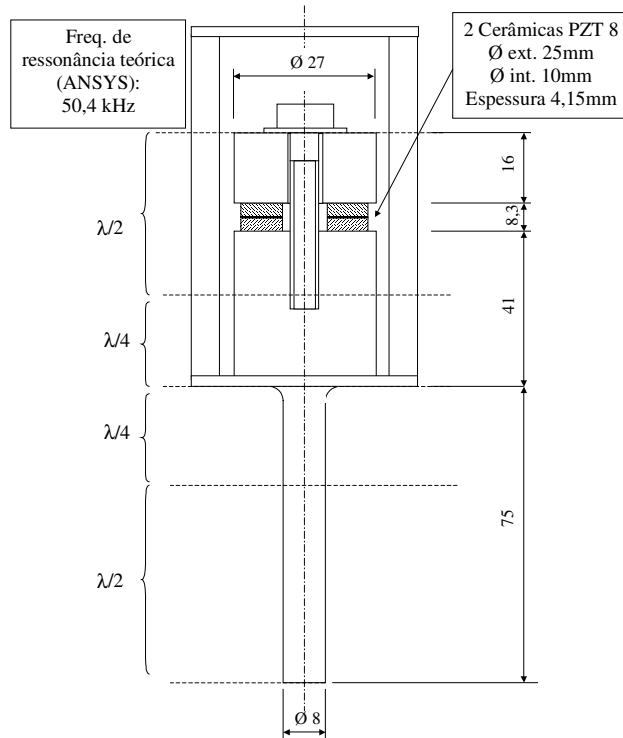


Fig. 5.3 – Representação esquemática do transdutor T2.

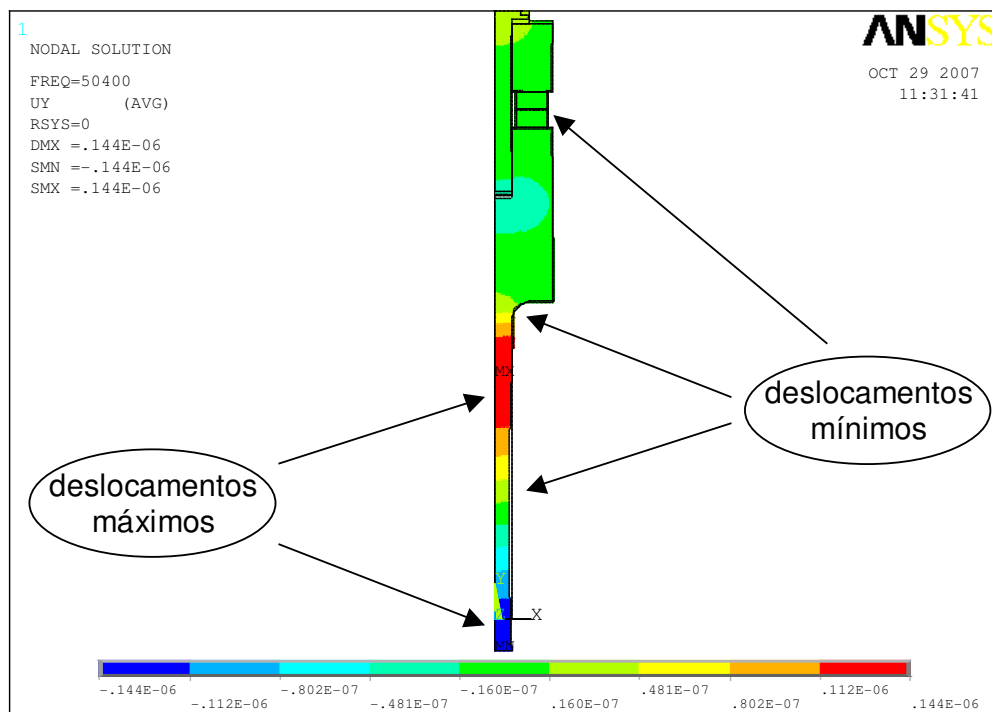


Fig. 5.4– ANSYS: Deslocamentos Uy do T2 (modelo axissimétrico).

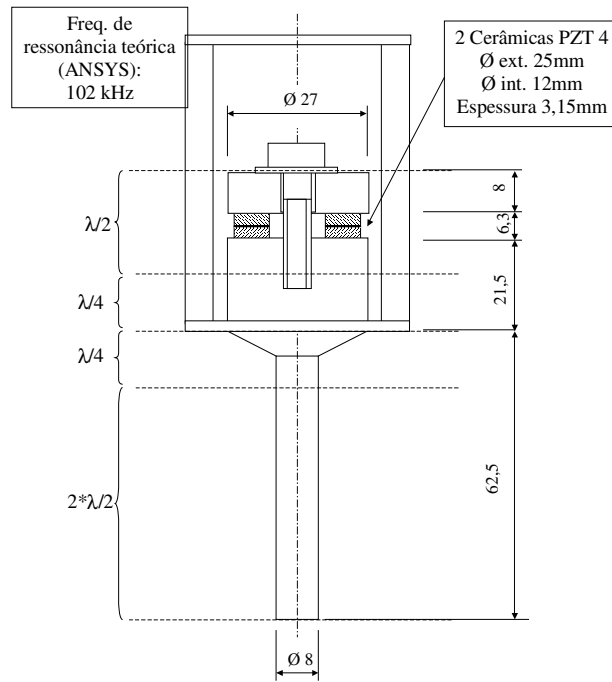


Fig. 5.5 – Representação esquemática do transdutor T3.

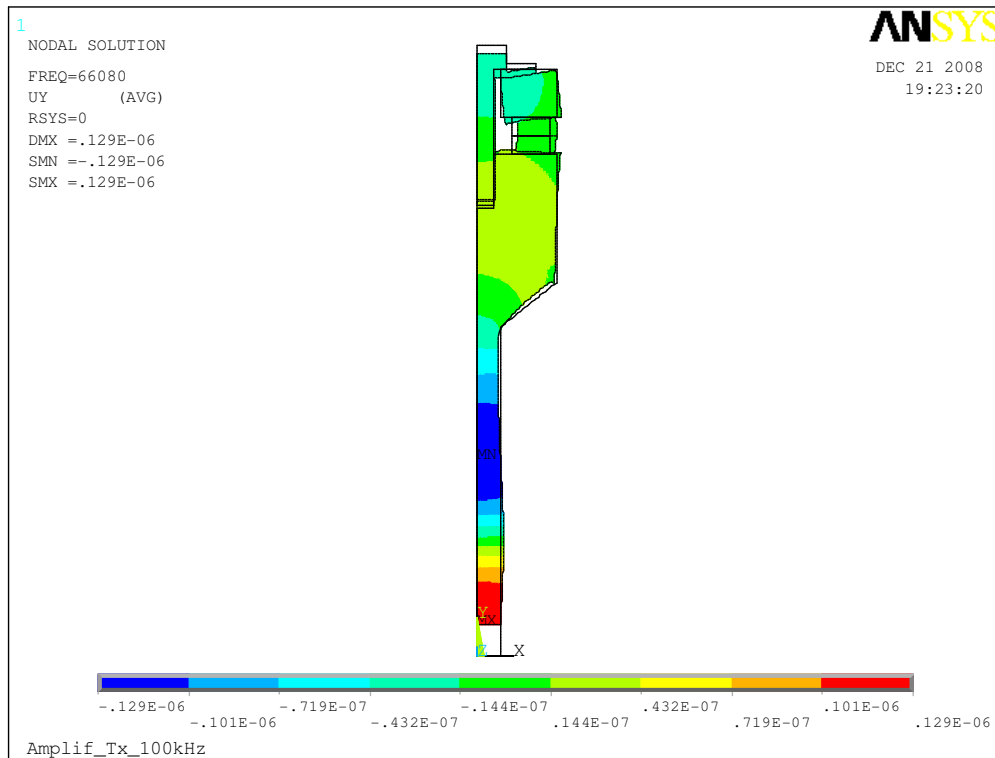


Fig. 5.6 – ANSYS: Deslocamentos U_y do T3 (modelo axissimétrico).

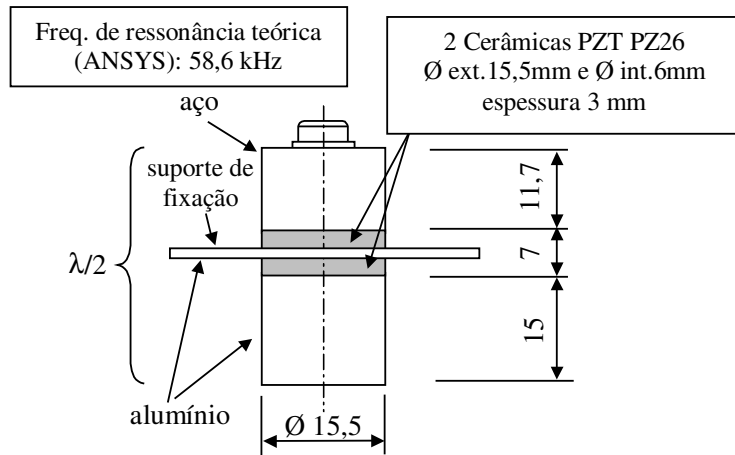


Fig. 5.7 – Representação esquemática do transdutor T4.

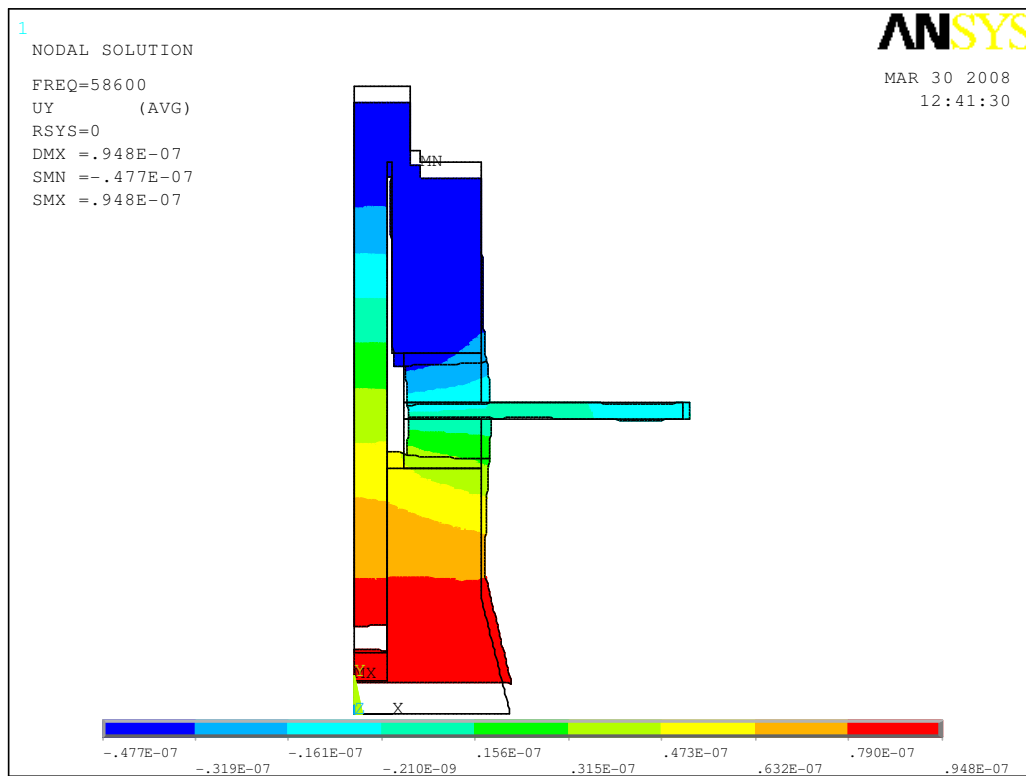


Fig. 5.8 – ANSYS: Deslocamentos Uy do T4 (modelo axissimétrico).

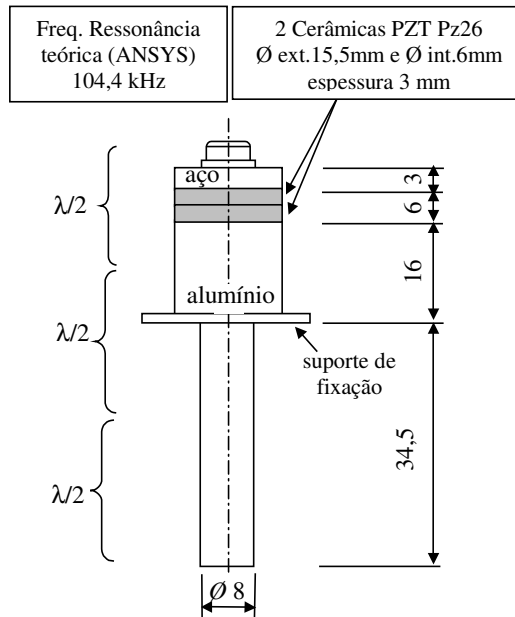


Fig. 5.9 – Representação esquemática do transdutor T6.

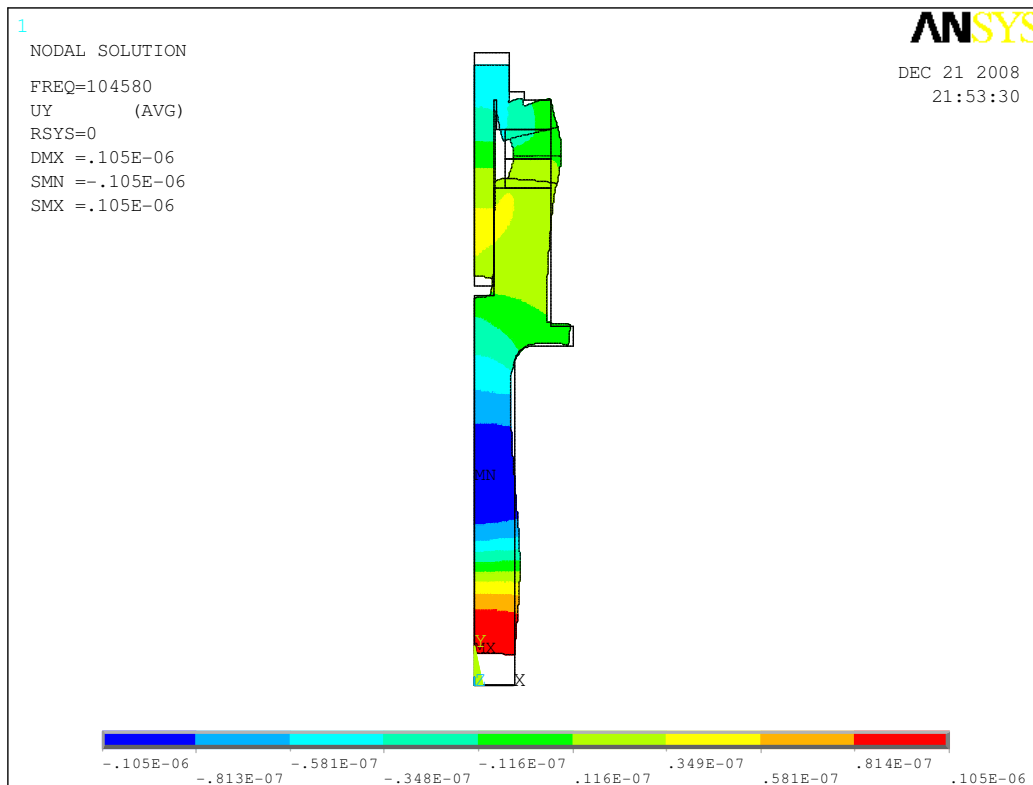


Fig. 5.10 – ANSYS: Deslocamentos Uy do T6 (modelo axissimétrico).

V. 2. CONSTRUÇÃO

A construção de transdutores foi iniciada no Laboratório de Ultrassom do Departamento de Engenharia Mecatrônica e de Sistemas Mecânicos da Escola Politécnica da USP, tendo sido montados três transdutores acoplados a amplificadores mecânicos (T1, T2 e T3).

O transdutor T1 (Fig. 5.11) foi montado com um disco de cerâmica PZT-8 (diâmetro = 25mm; espessura = 2mm) acoplada a um amplificador cônico. Os transdutores T2 (Fig. 5.12) e T3 (Fig. 5.13) foram montados em sanduíche (Langevin), aplicando-se uma pré-tensão de aproximadamente 30MPa, utilizando-se anéis de cerâmica PZT-8 (diâmetro externo = 25mm; diâmetro interno = 10mm; espessura = 4,15mm) e PZT-4 (diâmetro externo = 25mm; diâmetro interno = 12mm; espessura = 3,15mm), respectivamente.



Fig. 5.11 –Transdutor T1 construído.



Fig. 5.12 –Transdutor T2 construído.



Fig. 5.13 – Transdutor T3 construído.

Prosseguiu-se à etapa de construção de transdutores no *Departamento de Señales, Sistemas y Tecnologías Ultrasónicas – IA / CSIC*, Madri, Espanha. O transdutor T4 (Fig. 5.14) foi composto por anéis de cerâmica de menor diâmetro (diâmetro externo = 15,5mm; diâmetro interno = 6mm; espessura = 3mm) que os utilizados anteriormente, buscando-se evitar a sobreposição de modos de vibração indesejáveis, o que pode ocorrer quando o diâmetro das cerâmicas é maior que $\lambda/4$ (IULA *et al.*, 2002). Foram utilizadas cerâmicas de PZT tipo Pz26 da *Ferroperm* (correspondentes ao PZT-4). O amplificador mecânico foi dispensado, pois a ideia original de se introduzir os transdutores por cima da câmara de perfusão do coração foi descartada, já que não havia espaço pela possibilidade de interferência nas medições do transdutor de força. Ao invés disso, os transdutores foram acoplados com gel à lateral da câmara de perfusão do coração.



Fig. 5.14 – Transdutor T4 construído.

Após o estágio na Espanha, foi construído outro transdutor (T6, Fig. 5.15) utilizando-se anéis de cerâmica PZT Pz26 (diâmetro externo = 15,5mm; diâmetro interno = 6mm; espessura = 3mm). Também foi utilizado um transdutor de fisioterapia (TA, Fig. 5.16), montado com uma cerâmica tipo PZT-4 com 25mm de diâmetro, pelo grupo do Laboratório de Ultrassom do Departamento de Engenharia Mecatrônica da Escola Politécnica da USP.

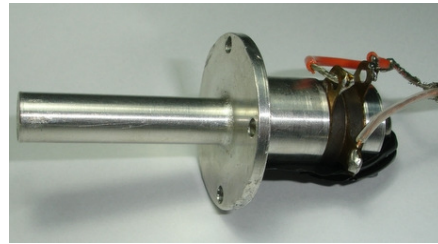


Fig. 5.15 – Transdutor T6 construído.

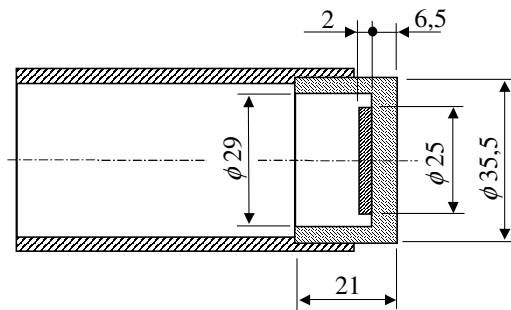


Fig. 5.16 – TA. (a) Representação esquemática. (b) Transdutor pronto.

V. 3. CARACTERIZAÇÃO EM FREQUÊNCIA

A caracterização com aplicação de potência simula a real operação dos transdutores e apresenta particularidades fundamentais quando comparada à caracterização convencional, feita no impedômetro fasorial com a aplicação de uma baixa tensão (0,1V). A excitação de transdutores com altos níveis de tensão elétrica provoca efeitos térmicos que podem gerar instabilidades no sistema. Espera-se que sua frequência de ressonância caia

com o aumento da tensão de excitação (RIERA *et al.*, 2007). Excitar o transdutor em uma frequência inadequada irá aquecer ainda mais o transdutor, o qual poderá se deteriorar em curto prazo.

Dessa forma, foram realizadas caracterizações com potência dos transdutores de baixa frequência T2, T3 e T4 (Langevin). O *Grupo de Ultrasonidos de Potencia – IA/CSIC* possui um sistema de varredura em frequência e tensão elétrica, que opera até aproximadamente 100kHz.

Estudos preliminares realizados com os transdutores T2 e T3 e T4 emitindo no ar mostraram uma redução da frequência de ressonância com o aumento da tensão aplicada. Isso foi feito a título de curiosidade, uma vez que a aplicação seria mesmo para propagação do ultrassom em água. Entretanto, é importante entender que esse é o comportamento esperado e que costuma ser maior para aplicações no ar. Na água esse deslocamento na frequência é reduzido, mas também pode ser observado.

Dessa forma, foi realizado um estudo para se investigar o comportamento dos transdutores T2, T3 e T4 com suas faces imersas em água. O T2 apresentou condutância elétrica de aproximadamente 1mS (Fig. 5.17 e Fig. 5.18) e frequência de ressonância de 50,3kHz (Fig. 5.19). O transdutor T3 tem condutância elétrica de 4mS (Fig. 5.20 e Fig. 5.21) e ressona em torno de 65,5kHz (Fig. 5.22). Nesse caso, observou-se cavitação a partir da aplicação de $37V_{pp}$. O transdutor T4 tem condutância de 1mS (Fig. 5.23 e Fig. 5.24) e frequências de ressonância variando entre aproximadamente 52,6kHz e 53,8kHz (Fig. 5.25).

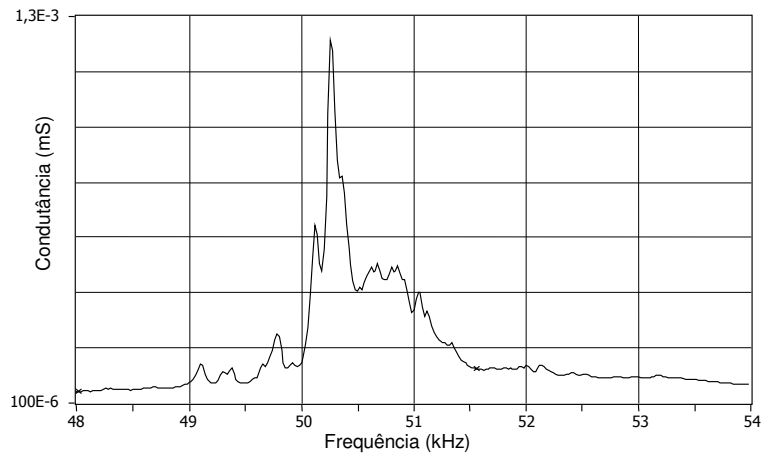


Fig. 5.17 – T2 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $5V_{pp}$. Pico: $G=1,21mS$; $f_r=50,3kHz$.

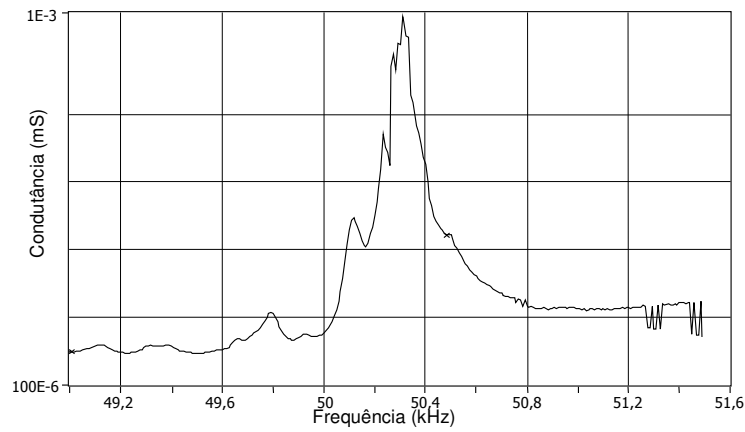


Fig. 5.18 – T2 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $75V_{pp}$. Pico: $G=1mS$; $f_r=50,3kHz$.

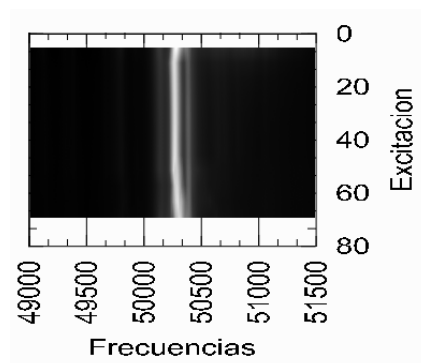


Fig. 5.19 – T2: condutância em função da frequência para aplicações de $5V_{pp}$ a $70V_{pp}$. Frequência de aproximadamente $50,3kHz$, independente da tensão aplicada.

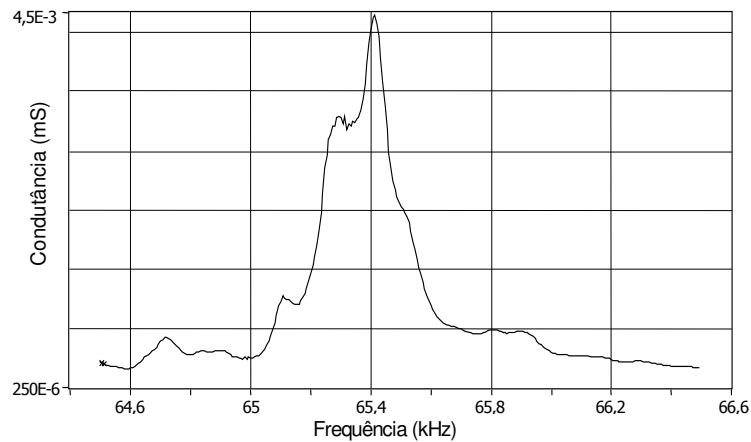


Fig. 5.20 – T3 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $10V_{pp}$. Pico: $G=4,8mS$; $f_r=65,4kHz$.

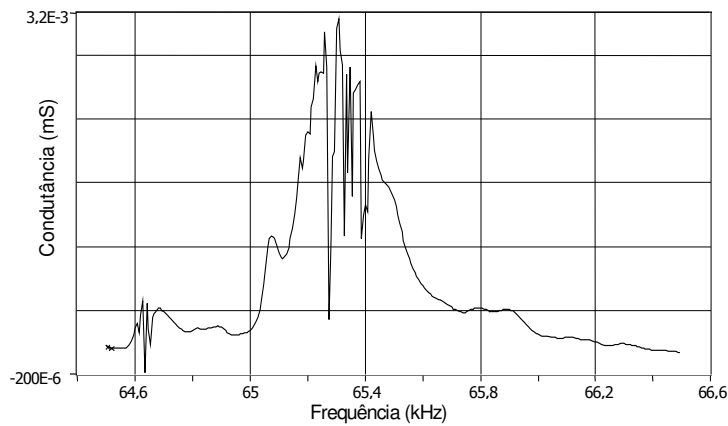


Fig. 5.21 – T3 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $50V_{pp}$. Pico: $G=3,1mS$; $f_r=65,3kHz$.

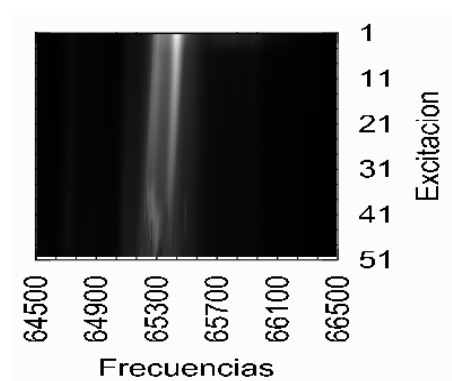


Fig. 5.22 – T3: condutância em função da frequência para aplicações de $1V_{pp}$ a $50V_{pp}$. Ocorreu cavitação a partir da aplicação de $37V_{pp}$. Frequência em torno de $65,5kHz$.

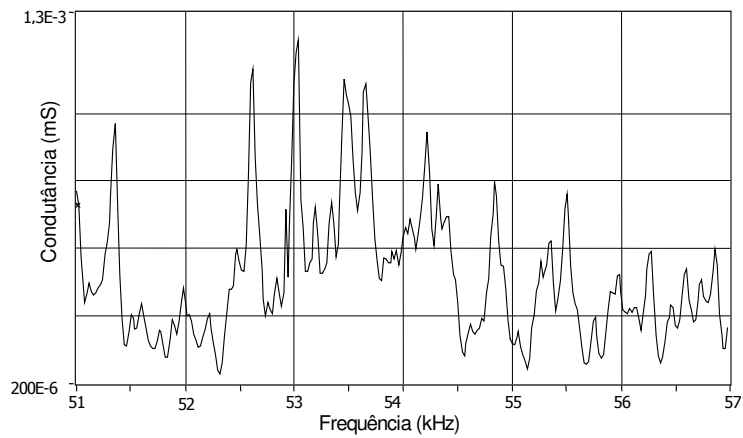


Fig. 5.23 – T4 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $5V_{pp}$. Pico: $G=1,2mS$; $f_r=53kHz$.

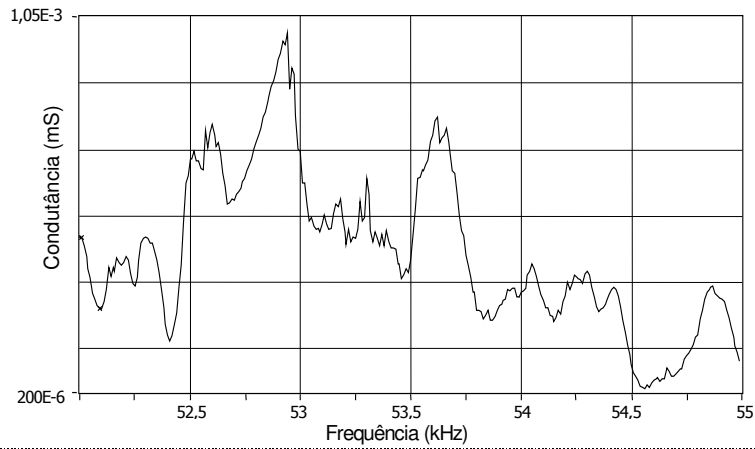


Fig. 5.24 – T4 com a face imersa em água: condutância elétrica (G) em função da frequência (f_r) para a aplicação de $75V_{pp}$. Pico: $G=1mS$; $f_r=52,9kHz$.

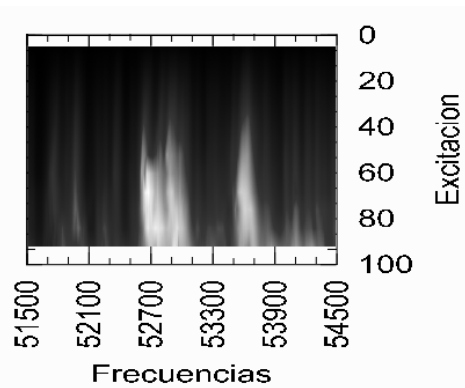


Fig. 5.25 – T4: condutância em função da frequência para aplicações de $5V_{pp}$ a $90V_{pp}$. Frequência de ressonância bastante variável entre aproximadamente 52,6kHz e 53,8kHz.

As curvas de impedância elétrica do T1 foram levantadas da forma convencional, utilizando-se o impedômetro Agilent 4294A 40Hz-110MHz (Santa Clara, CA, E.U.A.). O transdutor T1 apresenta ressonância em várias frequências em torno de 1 MHz, devido à sua geometria cônica. A fase passa pelo zero em algumas frequências, para as quais a magnitude da impedância é mínima e gira em torno de 30Ω (Fig. 5.26).

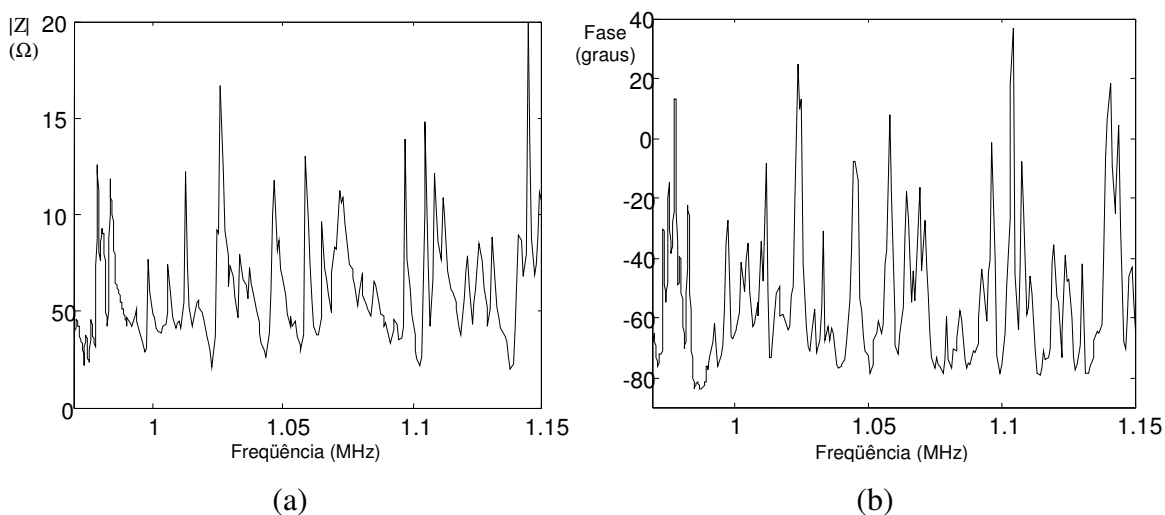


Fig. 5.26 – Impedância elétrica experimental do T1. (a) magnitude; (b) fase.

Os transdutores T6 e TA foram construídos posteriormente e foram caracterizados no impedômetro (HP 4194A 50Hz – 35MHz, Japão) com aplicação de 0,1V. As curvas de impedância elétrica em função da frequência são apresentadas, respectivamente, nas Fig. 5.27 e 5.28. A frequência de ressonância do T6 é 102kHz, ponto em que ocorre mudança de fase e a magnitude da impedância é mínima. O transdutor TA, por sua vez, vibra em torno de 1MHz, com impedância mínima (50Ω) associada a uma mudança de fase na frequência de 970kHz.

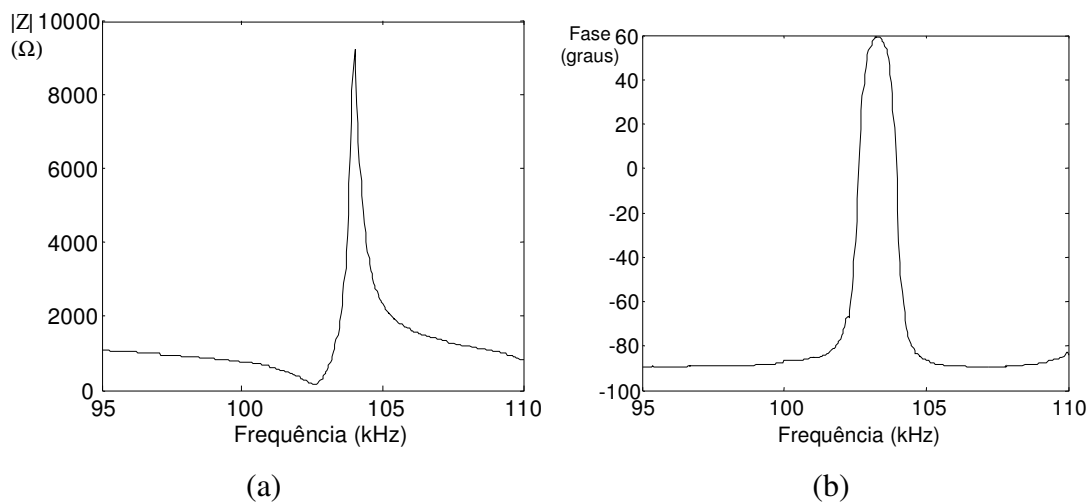


Fig. 5.27 – Impedância elétrica experimental do T6. (a) magnitude; (b) fase.

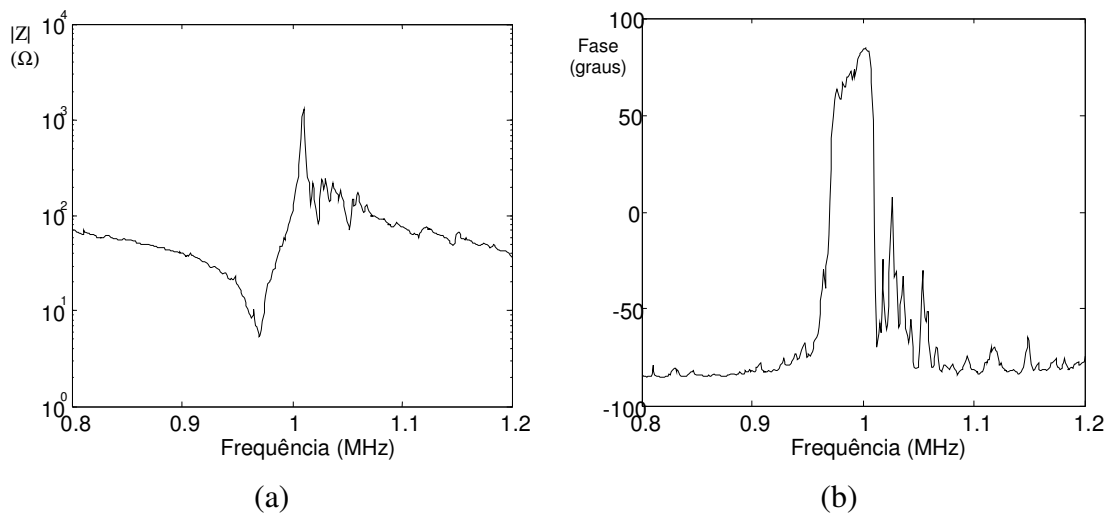


Fig. 5.28 – Impedância elétrica experimental do TA. (a) magnitude; (b) fase.

V. 4. CALIBRAÇÃO

V. 4. 1. Balança de força de radiação

O *Laboratorio de Metrologia – IA / CSIC* dá suporte às pesquisas realizadas no Instituto de Acústica. O sistema é dimensionado para altas frequências, uma vez que foi

desenvolvido com o intuito de calibrar transdutores de diagnóstico e de fisioterapia (MHz). Portanto, não foi possível calibrar os transdutores Langevin (T2, T3 e T4), que são da ordem de kHz. A Fig. 5.29 mostra o transdutor T1 sobre a balança de força de radiação.



Fig. 5.29 – Balança de radiação acústica com transdutor T1: medição da potência ultrassônica para cálculo da condutância de radiação do T1.

Um computador controla as medições, ligando e desligando o transdutor, e arquiva, em função do tempo, a tensão de entrada, a massa e a temperatura. Uma balança de radiação acústica mede a massa equivalente com o transdutor ligado e desligado algumas vezes. O sistema calcula uma média das massas equivalentes em cada situação e determina a diferença das massas equivalentes (Δm), a qual é convertida em potência ultrassônica (W) pela Eq. 5.1:

$$W = \Delta m \cdot g \cdot c(T), \quad (5.1)$$

onde g é a aceleração da gravidade e $c(T)$ é a velocidade do ultrassom na água em função da temperatura. A condutância de radiação G_r é, então, calculada segundo a Eq. 5.2:

$$G_r = \frac{W}{V_e^2}, \quad (5.2)$$

onde V_e é a tensão elétrica RMS aplicada (HEKKENBERG *et al.*, 2000).

As condutâncias de radiação calculadas para as frequências de 1MHz e de 977,5kHz, respectivamente, foram de 0,866mS e 4,45mS.

V. 4. 2. Hidrofonos

Os transdutores ultrassônicos TA (1MHz) e T3 (65,7kHz) foram escolhidos para a realização de experimentos *in vivo* por terem sido observados efeitos em experimentos *in vitro* com o uso dos mesmos. Antes de serem aplicados, os transdutores foram calibrados no *Bioacoustics Research Laboratory* da *University of Illinois at Urbana-Champaign*.

As calibrações foram conduzidas em um tanque acústico contendo água destilada, degaseificada, a 22°C. As calibrações foram realizadas em uma profundidade correspondente à região do campo em que se situa o coração nos experimentos com animais. Cada transdutor era mantido em uma posição fixa enquanto o hidrofone era movido pelo sistema de microposicionamento Daedal. Esse sistema permite o movimento nos três eixos de translação (2mm de precisão), e em torno de dois eixos angulares (precisão 0,02 graus).

Para o transdutor de 65,7kHz, usou-se o hidrofone modelo F42C 195, do Naval Undersea Warfare Center / Underwater Sound Reference Division. Trata-se de um hidrofone de PZT, esférico, com diâmetro interno de 20mm e diâmetro externo de 26mm, e constante de calibração de 39,8V/MPa para 65,7kHz. Um gerador de funções (Agilent 33250A) foi acoplado ao amplificador ENI 2100L (10kHz-12MHz, 50dB), tendo sido aplicados *bursts* de 80 ciclos (Fig. 5.30) com amplitudes de 25V_{pp}, 50V_{pp}, 75V_{pp}, 100V_{pp},

125V_{pp} e 150V_{pp}. As respostas do transdutor são apresentadas na Fig. 5.31. A Fig. 5.32 mostra o campo acústico gerado por esse transdutor.

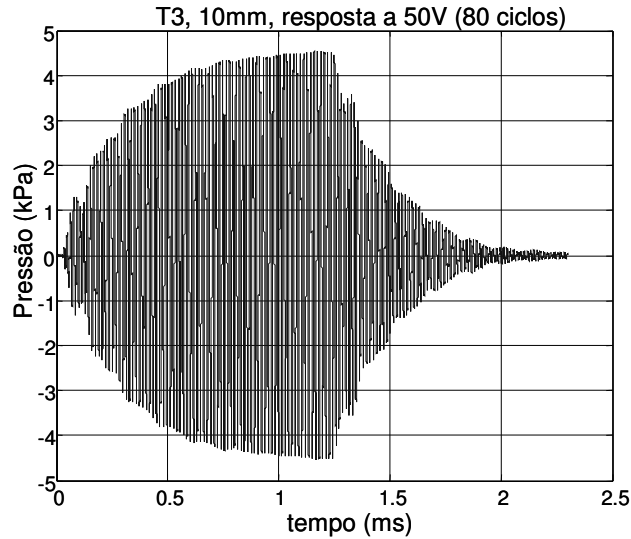


Fig. 5.30 – Resposta do transdutor T3 (65,7kHz) à aplicação um *burst* de 80 ciclos e 50V_{pp}.
Tem-se uma pressão pico espacial média temporal de aproximadamente 4,5kPa.

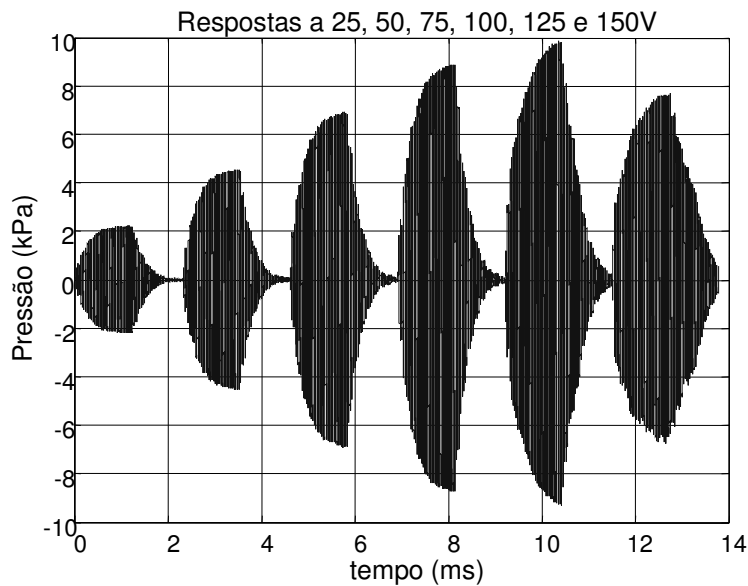


Fig. 5.31 – Respostas do transdutor T3 (65,7kHz) a aplicações de *bursts* de 80 ciclos com amplitudes de 25, 50, 75, 100, 125, 150V_{pp}, mostrando que não se deve aumentar a tensão acima de 125V_{pp}, pois a pressão de saída começa a cair.

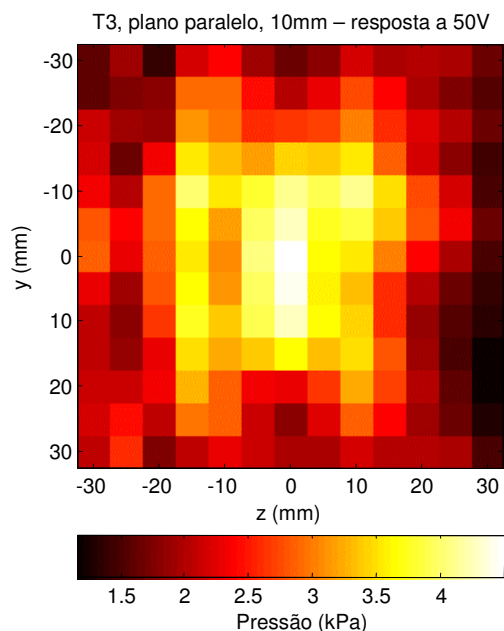


Fig. 5.32 – Distribuição espacial de pressão do transdutor T3 (65,7kHz) quando excitado por *bursts* de 80 ciclos com amplitude de $50V_{pp}$.

A calibração do transdutor de 1MHz foi realizada com um hidrofone calibrado de PVDF (GEC Marconi Y-34-3598 EW295), com elemento ativo de 0,5mm de diâmetro. O mesmo gerador de funções usado anteriormente foi acoplado a um amplificador de potência RF (ENI A150; 0.3 - 35MHz; 55dB) para excitar o transdutor com *bursts* de 50 ciclos (Fig. 5.33). As respostas do transdutor de 1MHz para excitações elétricas de 25 a $275V_{pp}$ são mostradas na Fig. 5.34. A Fig. 5.35 expõe o mapeamento do campo acústico e a Fig. 5.36 apresenta o perfil de pressão ao longo do diâmetro do campo em resposta à aplicação de $50V_{pp}$.

Para se obter a intensidade média temporal (I_{TA}) na região do pico espacial, ou seja, a intensidade $I_{SPTA}=300W/cm^2$, aplicou-se a Eq. 3.5, usando-se pico de pressão de 3MPa. No entanto, essa seria a média temporal para excitação contínua. Considerando-se o ciclo de trabalho de 1%, essa intensidade é, na realidade, a média no pulso (I_{SPPA}). Nesse caso, tem-se uma I_{SPTA} de aproximadamente de $3W/cm^2$.

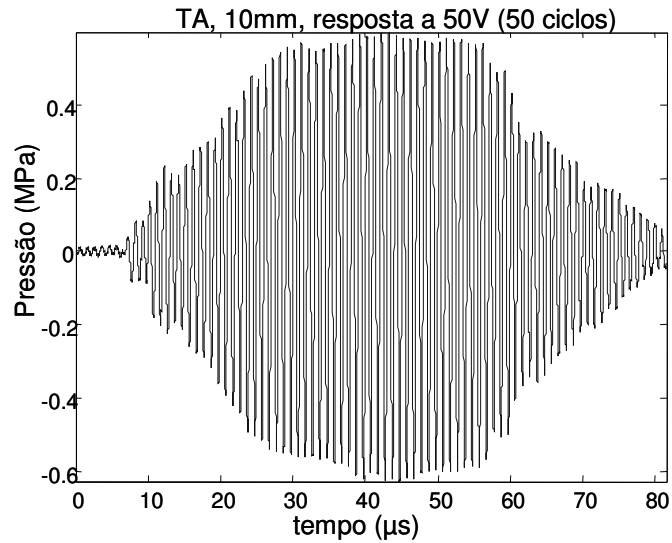


Fig. 5.33 – Resposta do transdutor TA (1MHz) à aplicação um *burst* de 50 ciclos com amplitude de $50V_{pp}$. Tem-se uma pressão pico espacial média temporal de aproximadamente 0,6MPa.

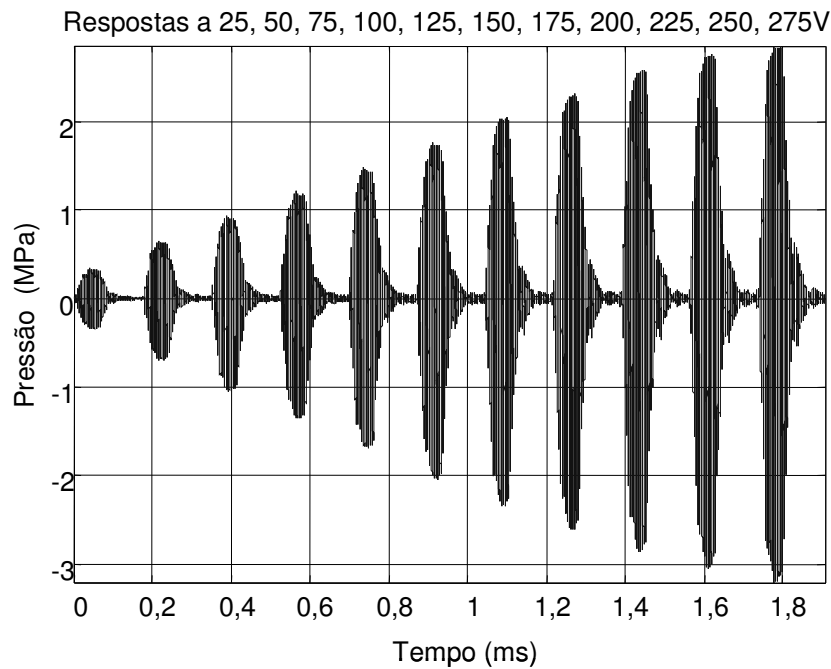


Fig. 5.34 – Respostas do transdutor TA (1MHz) a aplicações de *bursts* de 50 ciclos com amplitudes de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 V_{pp} , mostrando um comportamento bastante linear.

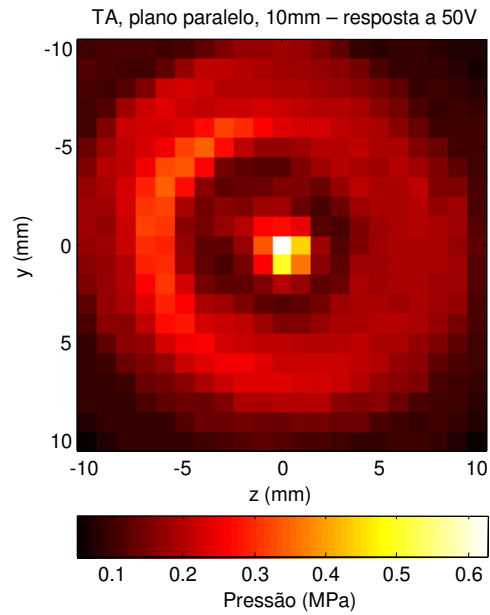


Fig. 5.35 – Campo acústico gerado pelo transdutor TA (1MHz) quando excitado por *bursts* de 50 ciclos com amplitude de $50V_{pp}$.

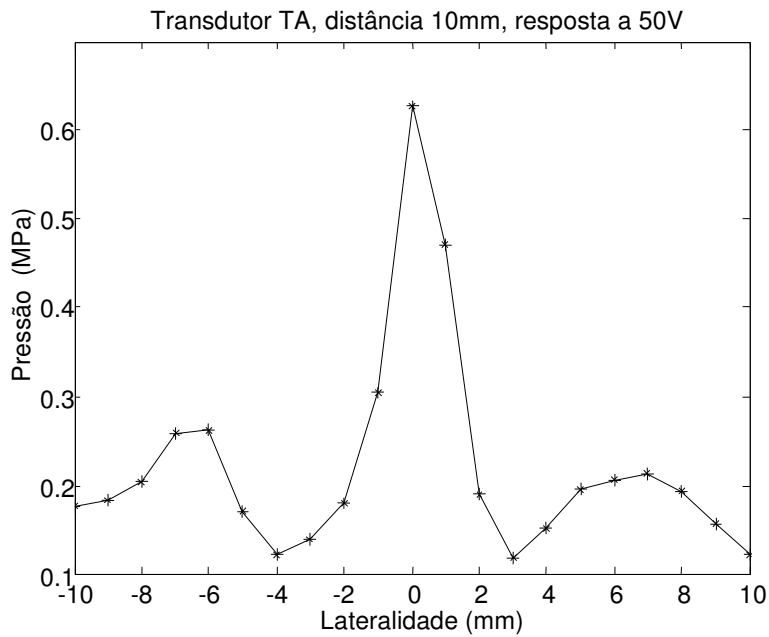


Fig. 5.36 – Perfil de pressão ao longo do diâmetro do campo, gerado pelo transdutor TA (1MHz) quando excitado por *bursts* de 50 ciclos com amplitude de $50V_{pp}$.

CAPÍTULO VI

EXPERIMENTOS *IN VITRO*

As propriedades de automaticidade (capacidade de iniciar seu próprio batimento) e ritmicidade (regularidade na atividade de marca-passo) permitem que um coração perfundido bata, ainda que tenha sido isolado do corpo (BERNE *et al.*, 2003). A preparação de coração isolado perfundido de mamífero foi estabelecida, em 1897, por Oscar Langendorff. Uma solução nutriente é entregue ao coração, a uma pressão constante ou a um fluxo constante, através de uma cânula inserida na aorta. A perfusão retrógrada pela aorta fecha os folhetos da válvula aórtica e, assim, a solução entra nas coronárias e sai pelo seio coronário do átrio direito.

As observações feitas usando o modelo levaram a relevantes descobertas que formam a base da fisiologia cardíaca, incluindo o papel da temperatura, oxigênio e Ca^{2+} na contração, a origem da atividade elétrica no átrio, e o efeito cronotrópico negativo da estimulação vagal. O próprio Langendorff demonstrou que o coração é nutrido e oxigenado pela circulação coronária, e que alterações nessa circulação afetam a função mecânica do coração. A simplicidade e baixo custo do modelo o tornam uma ferramenta bastante útil para a pesquisa cardiovascular (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007).

Os experimentos com coração *in vitro* foram realizados no Centro de Engenharia Biomédica - CEB/UNICAMP, tendo sido uma interação entre o Laboratório de Ultrassom (LUS/CEB/UNICAMP) e o Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (LPCv/CEB/UNICAMP). Os transdutores aplicados nos experimentos foram: T1 (1MHz, com amplificador mecânico), T3 (65,7kHz), T6 (102kHz) e TA (1MHz, sem amplificador mecânico).

O transdutor T2 (50kHz) apresentava alto descasamento de impedância elétrica com o amplificador de RF, o que foi contornado pela construção de um transformador (800 a 50Ω). Entretanto, durante a realização dos experimentos, havia certa dificuldade em se posicionar o trafo devido à limitação de espaço. Para a utilização do transdutor T4 (54,8kHz), havia dificuldade semelhante. A frequência desses dois transdutores (T2 e T4) era próxima à do T3 (65,7kHz), que funcionava bem sem necessidade de trafo. Durante as caracterizações com aplicação de potência, o T3 se mostrou o mais eficiente dentre esses três transdutores, apresentando uma condutância elétrica aproximadamente quatro vezes maior que a dos demais.

VI. 1. METODOLOGIA

VI. 1. 1. Animais

As condições experimentais foram aprovadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do IB/UNICAMP (protocolos 1517-1 e 1737-1, ANEXO 1). Foram usados ratos Wistar (n=4) fêmeas, com idade de 13 meses. Para os experimentos preliminares, foram usadas duas fêmeas de 12 meses e um macho de 3 meses de idade. Os ratos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP) foram mantidos no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB/UNICAMP) em gaiolas plásticas coletivas, sendo 2 a 3 animais por gaiola, com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*.

Realizava-se eutanásia por exsanguinação com prévia concussão cerebral, seguida por toracotomia e remoção do coração, ainda em atividade. O coração isolado era colocado em um recipiente contendo solução de Krebs-Henseleit modificada (composição: 115mM NaCl; 4,6mM KCl; 1,5mM CaCl₂.2H₂O; 1,2mM KH₂PO₄; 0,5mM NaHCO₃; 1,2mM MgSO₄.7H₂O; e 11,1mM glicose). Iniciava-se a montagem do coração com a base invertida (Fig. 6.1.a). Procedia-se à canulação da aorta (Fig. 6.1.b), e rapidamente

perfundia-se o coração com solução heparinizada. A seguir, inseria-se um gancho de aço inoxidável ao ápice dos ventrículos, para medição da força desenvolvida. A base da câmara era então invertida, fixada a um suporte, e presa ao corpo da câmara. O fio de algodão preso ao gancho inserido no ventrículo era conectado ao transdutor de força (Fig. 6.1.c). Aplicava-se pré-carga de 1,5 gf. Após 30 minutos para estabilização das contrações, iniciava-se o experimento (Fig. 6.1.d).

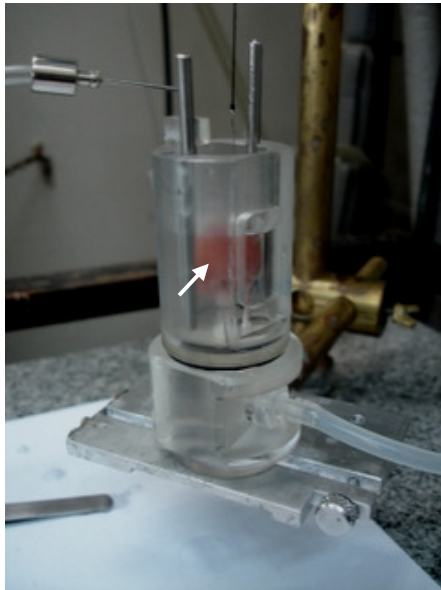
O coração se contraía espontaneamente, com exceção de um dos usados em estudo preliminar. Foi usada, para perfusão do coração, a solução de Krebs-Henseleit modificada, que era aquecida e saturada com carbogênio (95%O₂ / 5%CO₂) numa cuba, e fluía por gravidade à temperatura de 30°C, a um fluxo de aproximadamente 8mL/min. A solução entrava pela cânula situada na base da câmara, pela aorta (perfusão retrógrada). O coração permanecia imerso na solução do efluxo. O nível de solução na câmara era mantido por aspiração por uma cânula conectada a uma bomba de vácuo.



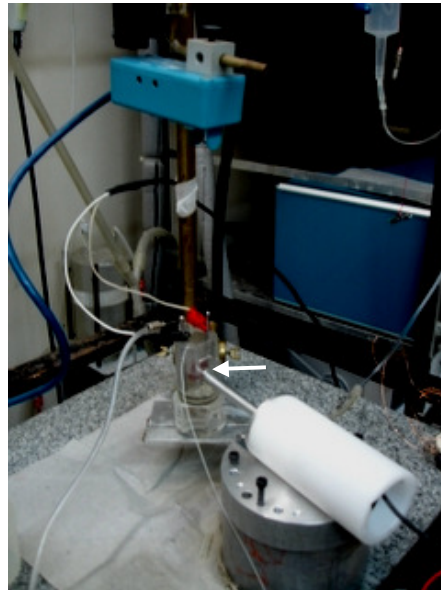
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 6.1 – Montagem do coração perfundido de rato. (a) Base da câmara (invertida) antes da canulação da aorta. (b) Aorta canulada e fixada à base da câmara; c) Coração sob perfusão retrógrada, com o ápice voltado para cima e preso ao transdutor de força; os 2 cilindros de metal são eletrodos estimulatórios; d) Aplicação de ultrassom ao coração através da janela acústica da câmara de perfusão.

VI. 1. 2. Montagem experimental

Para a aplicação de ultrassom ao coração isolado de ratos Wistar, utilizou-se o arranjo experimental mostrado no diagrama na Fig. 6.2, montado com equipamentos dos Laboratórios de Ultrassom (LUS/CEB/UNICAMP) e de Pesquisa Cardiovascular (LPCv/CEB/UNICAMP).

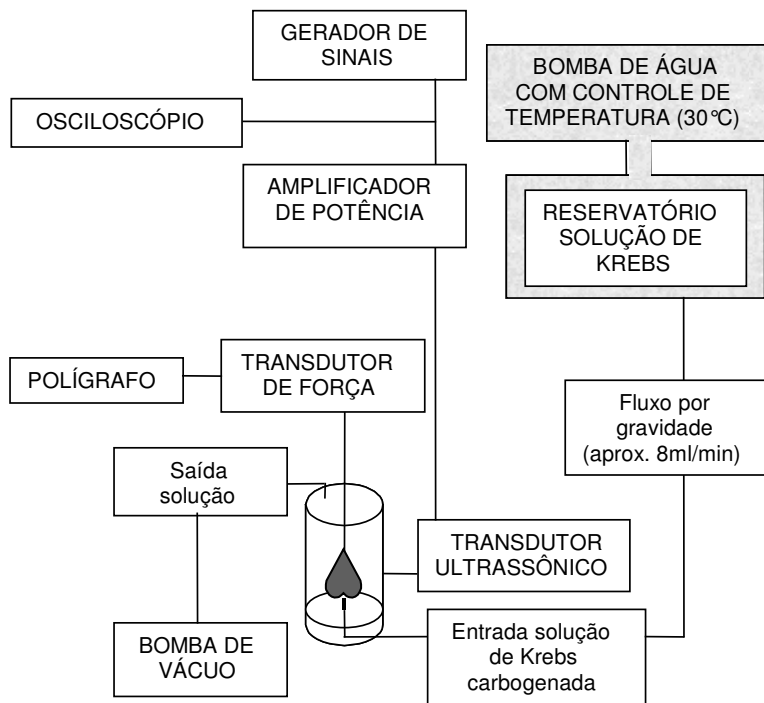


Fig. 6.2 – Diagrama de blocos do arranjo experimental.

Os equipamentos usados para aplicação e medição de ultrassom foram: osciloscópio Agilent Technologies DSO5012A (Santa Clara, CA, E.U.A.), gerador de sinais Agilent Technologies 33220A (Santa Clara, CA, E.U.A.), amplificador de RF Amplifier Research 75A-250 (Souderton, PA, E.U.A.), hidrofone de 1mm de diâmetro com pré-amplificador de 10dB submersível e *hydrophone booster amplifier* - Precision Acoustics HA1 50kHz-125MHz (Dorchester, Reino Unido), e transdutores ultrassônicos (construídos no presente trabalho). Para montagem da preparação biológica e registro de

contrações, foram usados os seguintes equipamentos: transdutor isométrico de força Myograph F-60 Narco Bio Systems (Houston, TX, E.U.A.), polígrafo Narcotrace 40 Narco Bio Systems (Houston, TX, E.U.A.), acoplador universal 7189 (amplificador e filtros) Narco Bio Systems (Houston, TX, E.U.A.), bomba de vácuo, bomba de água com controle de temperatura desenvolvida na Área de Pesquisa e Desenvolvimento do CEB/UNICAMP OS 02/4785.

A tensão sistólica (isto é, a diferença entre o pico sistólico de tensão e a tensão diastólica) e a frequência cardíaca eram monitoradas a partir do registro em papel das contrações desenvolvidas pelo coração. Antes do início de cada experimento, o transdutor de força era calibrado, registrando-se a deflexão da pena em resposta a uma massa de 0,5g, para cada sensibilidade (S50 e S100).

Antes de se iniciar o registro de força, posicionava-se o hidrofone atrás do coração para se verificar a passagem da onda ultrassônica pelo coração. A Fig. 6.3 mostra um exemplo da aquisição de sinais pelo osciloscópio. O canal 1 está ligado à saída do gerador de sinais que, nesse exemplo, operava com ciclo de trabalho de 50%. Esse sinal foi amplificado antes de excitar o transdutor ultrassônico, o qual foi acoplado com gel à janela acústica da câmara, de modo que emissão da onda ultrassônica fosse dirigida ao meio em que se encontrava o coração perfundido. Um hidrofone foi posicionado atrás do coração, apontando para a base da câmara, e não para o transdutor ultrassônico como seria ideal, por uma limitação de espaço. O hidrofone recebe o sinal ultrassônico que atravessa o coração (mostrado no canal 2), de forma que se confirma a presença da onda ultrassônica.

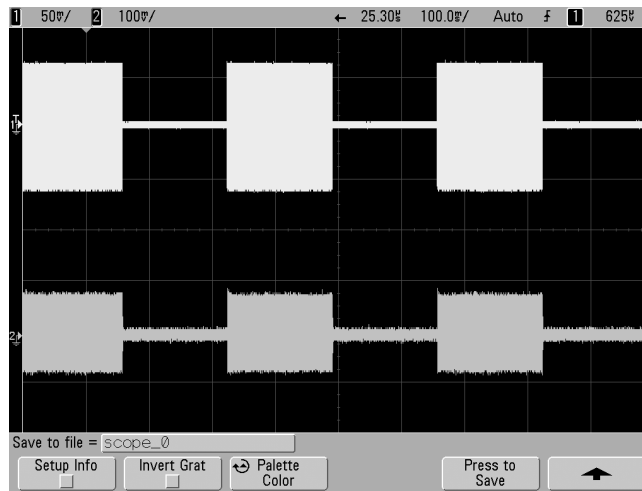


Fig. 6.3 – Aquisição de sinais pelo osciloscópio. Canal 1 (superior): sinal de saída do gerador de sinais; canal 2 (inferior): sinal recebido pelo hidrofone colocado na câmara de perfusão atrás do coração.

VI. 1. 3. Experimentos preliminares

O T3 pode ser considerado o melhor transmissor dentre os transdutores do tipo Langevin construídos, por ter a mais alta condutância elétrica (4mS). Por esse motivo, foi utilizado no primeiro experimento preliminar com coração isolado de fêmea, do qual os átrios haviam sido removidos. Ultrassom foi aplicado através de uma câmara com linha de retardo de acrílico, quando se observou alguma interferência na atividade cardíaca, com aplicação contínua de $25V_{pp}$.

Realizaram-se mais dois experimentos preliminares, um com coração isolado de fêmea e um com coração de macho, ambos com átrios. Variaram-se amplificação e modo de operação (contínuo e *bursts* compatíveis com ciclos de trabalho de 50%) para os transdutores T1 e T3. Durante o terceiro experimento preliminar aplicou-se estimulação elétrica a 2Hz (estimulador elétrico APD/CEB/UNICAMP OS 02/795). Como não se observaram quaisquer efeitos consistentes da aplicação de ultrassom nesses dois experimentos, optou-se por realizar a sequência de quatro experimentos posteriores com coração isolado de fêmea sem átrios, conforme o primeiro experimento preliminar,

testando-se, em cada preparação, todos os transdutores viáveis em variados modos de operação.

VI. 1. 4. Sequências experimentais

Em coração isolado de rato Wistar, fêmea, sem átrios, aplicou-se ultrassom (tanto contínuo quanto pulsado) por 1 minuto com tensão de excitação correspondente a $52V_{pp}$ ($100mV_{pp}$ no ganho máximo do amplificador de RF). O intervalo entre dois testes sucessivos foi de 1 a 15 minutos, sendo os intervalos para troca de transdutores os mais longos. No caso da excitação pulsada, por uma limitação do sistema, só se pode excitar com pulsos de até 50000 ciclos. Foram testados os seguintes transdutores e modos de aplicação:

A) TA - f_r : 1MHz (T = 0,001ms)

1. Excitação contínua
2. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 5Hz / 200ms
Ciclo de trabalho 25%: 100ms = *burst* de 50.000 ciclos
3. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 3Hz / 333ms
Ciclo de trabalho 10%: 33,3ms = *burst* de 33.000 ciclos

B) T1 - f_r : 1MHz (T = 0,001ms)

1. Excitação contínua
2. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 5Hz / 200ms
Ciclo de trabalho 25%: 100ms = *burst* de 50.000 ciclos
3. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 3Hz / 333ms
Ciclo de trabalho 10%: 33,3ms = *burst* de 33.000 ciclos

C) T3 - f_r : 65,7kHz (T = 0,0152ms)

1. Excitação contínua
2. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 5Hz / 200ms
Ciclo de trabalho 10%: 20ms = *burst* de 1.316 ciclos

3. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 3Hz / 333ms

Ciclo de trabalho 50%: 166,5ms = *burst* de 10.954 ciclos

Ciclo de trabalho 10%: 33,3ms = *burst* de 2.190 ciclos

D) T6 - f_r : 102kHz ($T = 0,0098ms$)

1. Excitação contínua

2. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 5Hz / 200ms

Ciclo de trabalho 50%: 100ms = *burst* de 10.204 ciclos

3. Frequência de repetição de pulso / Período de repetição de pulso: 3Hz / 333ms

Ciclo de trabalho 50%: 166,5ms = *burst* de 16.990 ciclos

Ciclo de trabalho 10%: 33,3ms = *burst* de 3.398 ciclos

VI. 2. RESULTADOS

VI. 2. 1. Experimentos preliminares

Os registros apresentados referem-se ao primeiro experimento realizado, em coração isolado de fêmea sem átrios, quando se observaram interferências na atividade cardíaca. Aplicou-se um *burst* de ultrassom de 65,7kHz, 25V_{pp}, por 3s. Foi induzida arritmia reversível (i.e., extra-sístole), seguida de uma potenciação pós-extra-sistólica da força, como mostra a Fig. 6.4.

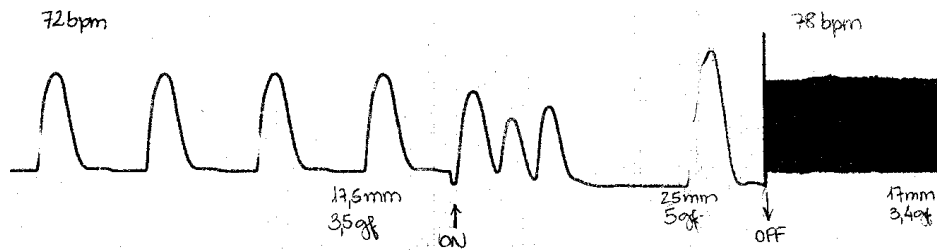


Fig. 6.4 – Experimento realizado em coração isolado de fêmea sem átrios. Aplicação de um *burst* de ultrassom de 65,7kHz, 25V_{pp}, durante 3s. Arritmia reversível induzida logo no início da aplicação de ultrassom. A escala de tempo está comprimida após estímulo.

A Fig. 6.5 apresenta uma sequência de registros durante a aplicação de vários *bursts* de 65,7kHz, totalizando cerca de 40s, com aplicação de aproximadamente 2kPa. Houve algumas extra-sístoles logo após aplicação de ultrassom, provavelmente dependentes da fase do ciclo cardíaco em que foi aplicado. Após remoção do ultrassom, ocorreu arritmia.

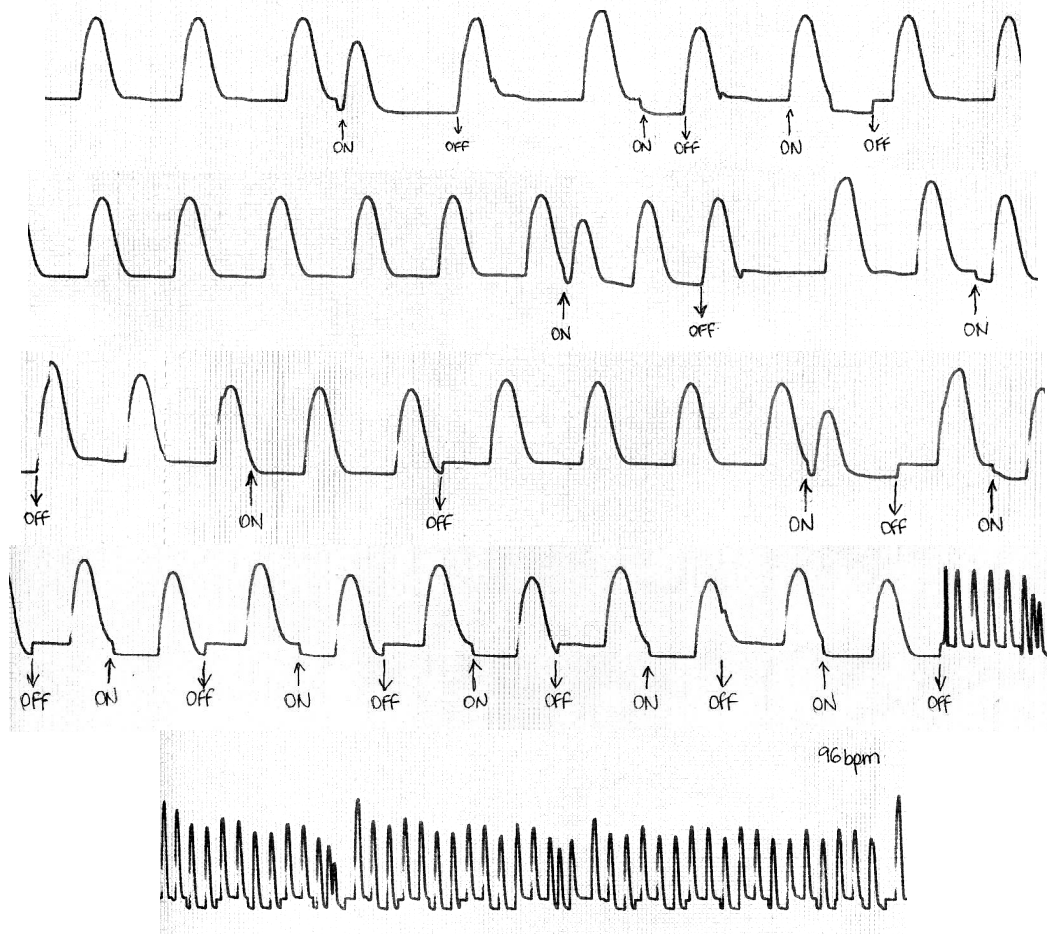


Fig. 6.5 – Registros em sequência. *Bursts* de 65,7kHz e 25V_{pp}, totalizando cerca de 40s. Extra-sístoles logo após aplicação de ultrassom, possivelmente dependentes da fase do ciclo cardíaco em que foi aplicado. Após remoção do estímulo, houve arritmia.

Induziu-se taquiarritmia com estímulo elétrico para a tentativa de reversão por ultrassom. Aplicou-se um *burst* curto de 65,7kHz e 25V_{pp}. Na sequência, arritmia foi

eletricamente induzida mais duas vezes. Como o coração foi capaz de se recuperar na ausência da aplicação de ultrassom, é provável que a primeira reversão observada tenha sido espontânea, e não devida à aplicação do ultrassom (Fig. 6.6).

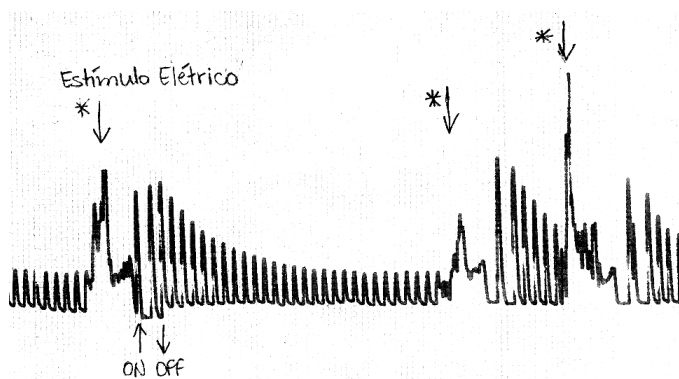


Fig. 6.6 – Taquiarritmia por estímulo elétrico. Tentativa de reversão por um *burst* curto de ultrassom de 65,7kHz e 25V_{pp}. A primeira reversão provavelmente não dependeu da aplicação do ultrassom, já que há duas reversões na ausência de estímulo ultrassônico.

VI. 2. 2. Sequências experimentais

Os valores basais de tensão sistólica e frequência espontânea obtidos logo após os 30 minutos de estabilização dos corações estão expostos na Tabela VI.1, que apresenta ainda as médias mais ou menos erro padrão, assim como o intervalo de confiança de 95%.

Tabela VI.1 – Valores basais de tensão sistólica e frequência espontânea (n = 4). Legenda:

EP = erro padrão; IC = intervalo de confiança

CORAÇÃO	TENSÃO SISTÓLICA (gf)	FREQUÊNCIA ESPONTÂNEA (bpm)
1	3,00	96,00
2	2,86	148,00
3	2,46	165,00
4	2,25	60,00
MÉDIA ± EP	2,64 ± 0,17	117,25 ± 24,07
IC 95%	(2,24 – 3,06)	(60,60 – 173,90)

Mesmo sem o átrio direito, onde se localiza o marca-passo primário, o coração continua batendo espontaneamente, provavelmente devido à atividade marca-passo do nódulo átrio-ventricular ou mesmo células do sistema de condução de His-Purkinje. Isto explicaria porque a frequência espontânea dos corações variou bastante: cada tipo de célula que apresenta atividade rítmica espontânea opera numa faixa diferente de duração de ciclo.

As Figs. 6.7 – 6.10 mostram trechos dos traçados originais de contrações registradas de diferentes corações durante a aplicação de ultrassom (ver detalhes na legenda de cada figura). A simples observação deixa claro que não houve alterações marcantes ou consistentes da força ou da frequência de contração durante da aplicação de ultrassom.

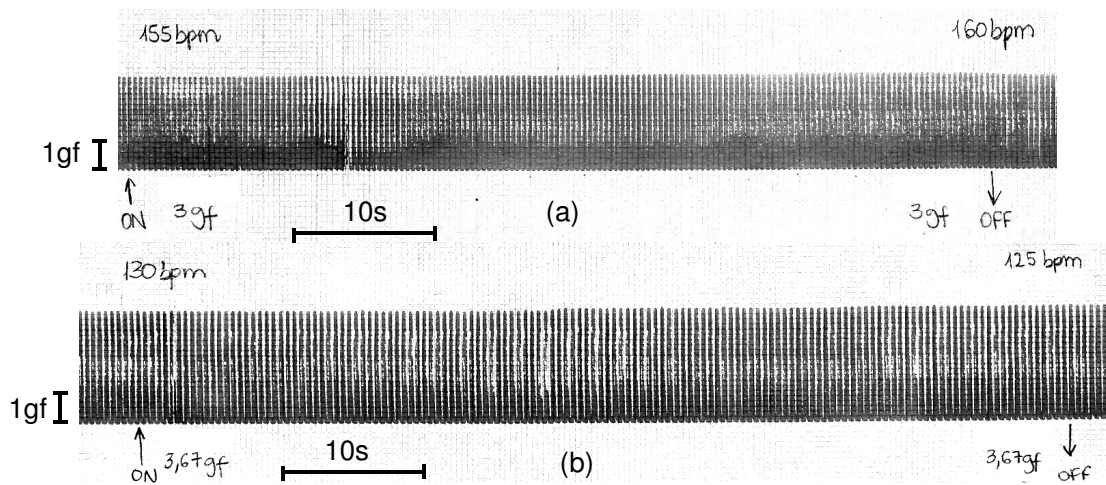


Fig. 6.7 – Respostas (força em função do tempo) a excitações por *bursts* correspondentes a ciclos de trabalho de 10%, FRP de 3Hz, e duração de 1 minuto. (a) Aplicação de $52V_{pp}$ ao T3 (65,7kHz). (b) Aplicação de $52V_{pp}$ ao TA (1MHz).

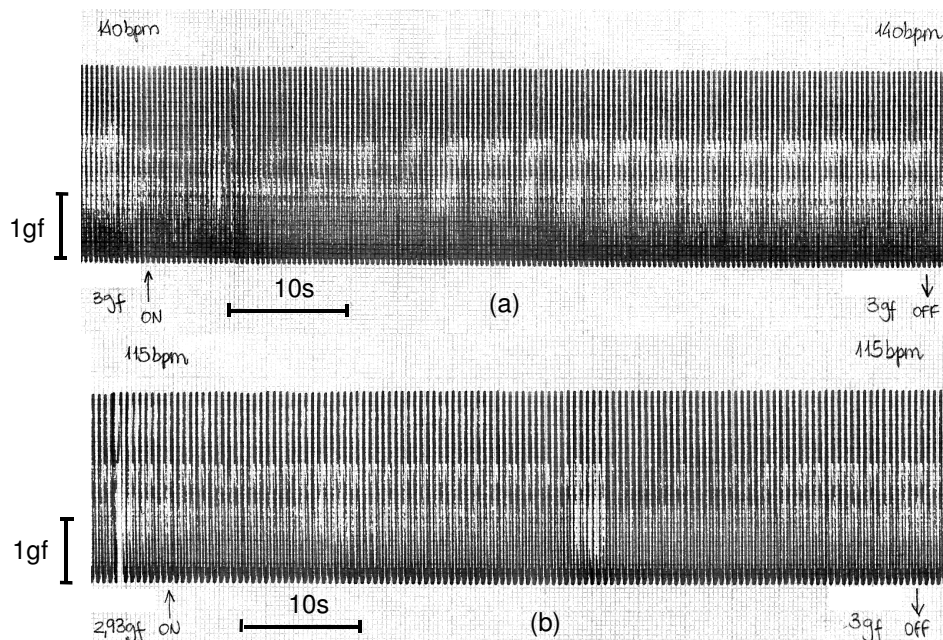


Fig. 6.8 – (a) Resposta à excitação por *bursts* correspondentes a ciclos de trabalho de 50%, FRP de 5Hz, duração de 1 minuto, e aplicação de $52V_{pp}$ ao T6 (102kHz). (b) Resposta à excitação contínua por 1 minuto com aplicação de $52V_{pp}$ ao T1 (1MHz).

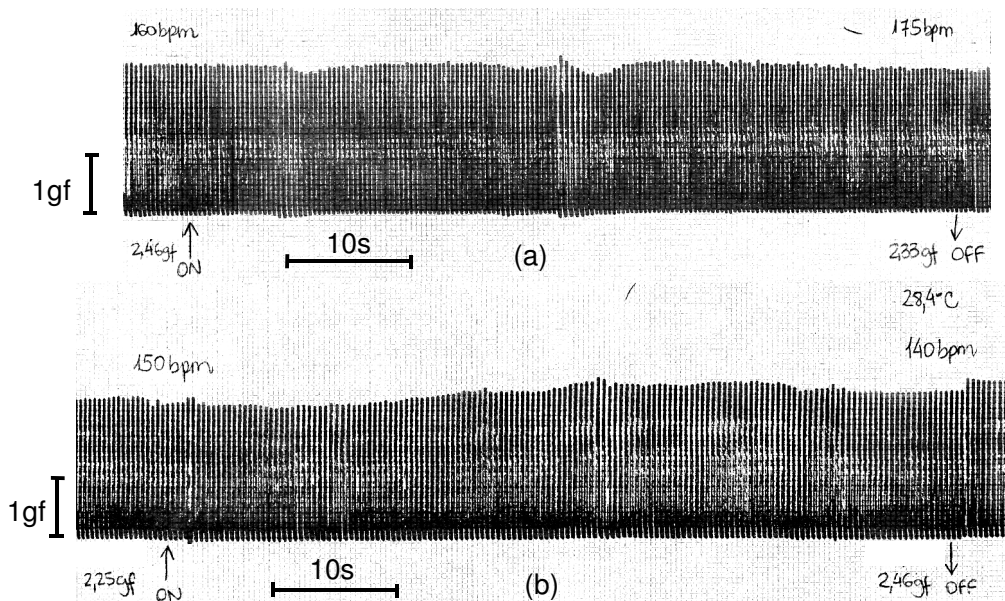


Fig. 6.9 – Respostas a excitações por *bursts* correspondentes a ciclos de trabalho de 25%, FRP de 5Hz, e duração de 1 minuto. (a) Aplicação de $52V_{pp}$ ao T1 (1MHz). (b) Aplicação de $52V_{pp}$ ao TA (1MHz).

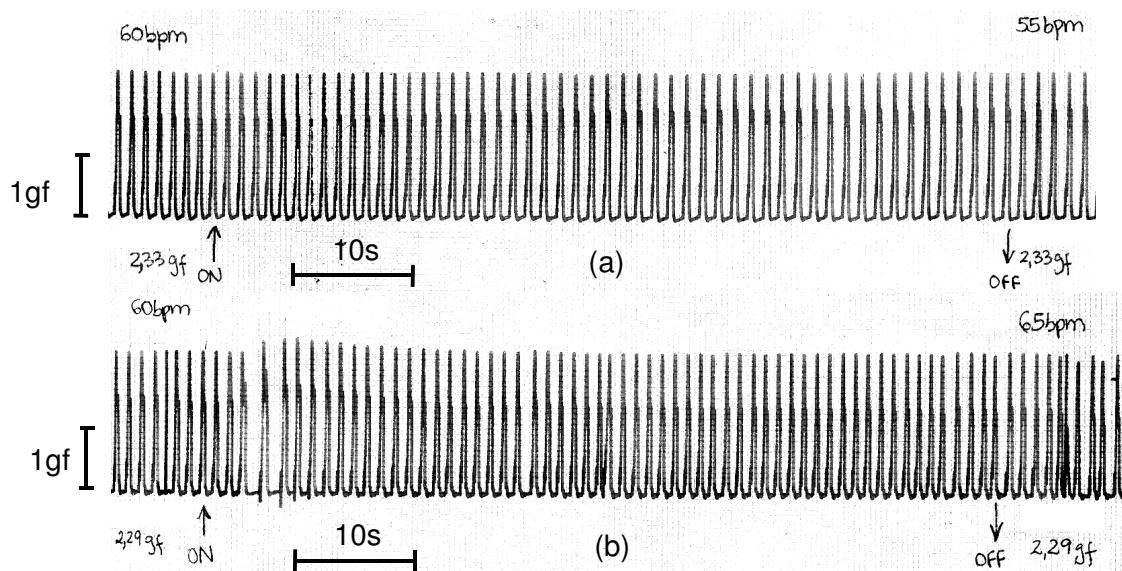


Fig. 6.10 – (a) Resposta à excitação por *bursts* correspondentes a ciclos de trabalho de 10%, FRP de 3Hz, duração de 1 minuto, e aplicação de $52V_{pp}$ ao T6 (102kHz). (b) Resposta à excitação contínua por 1 minuto com aplicação de $52V_{pp}$ ao T3 (65,7kHz).

VI. 2. 3. Análise estatística

A tensão sistólica e a frequência cardíaca foram medidas imediatamente antes da aplicação de ultrassom (valores pré-teste) e durante os últimos segundos de exposição (valores pós-teste). Os valores pós-teste normalizados são a razão entre os valores absolutos pós- e pré-teste. A Tabela VI.2 mostra os valores de tensão sistólica e frequência espontânea antes e após diferentes modos de aplicação de ultrassom com o transdutor T1.

Tabela VI.2 – Força e frequência cardíaca pré- e pós-teste, para cada modo, usando o T1 (1MHz). Os valores normalizados (NORM.) foram usados para a análise estatística. São apresentados os valores da média e erro padrão (EP).

MODO	CORAÇÃO	FORÇA PRÉ(gf)	FORÇA PÓS(gf)	FORÇA PÓS NORM.	FREQ. PRÉ(bpm)	FREQ. PÓS(bpm)	FREQ. PÓS NORM.
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 10 % - Duração: 1'	1	3,17	3,17	1,00	150	155	1,03
	2	3,00	3,00	1,00	120	120	1,00
	3	2,58	2,50	0,97	150	155	1,03
	4	2,50	2,50	1,00	60	65	1,08
	MÉDIA	2,81	2,79	0,99	120	124	1,04
	EP	0,16	0,17	0,01	21	21	0,02
- Frequência de repetição de pulso: 5Hz - Ciclo de trabalho: 25 % - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	2,89	2,86	0,99	130	125	0,96
	3	2,46	2,33	0,95	160	175	1,09
	4	-	-	-	-	-	-
	MÉDIA	2,68	2,60	0,97	145	150	1,03
	EP	0,22	0,27	0,02	15	25	0,07
- Onda contínua - Duração: 1'	1	3,33	3,33	1,00	160	145	0,91
	2	2,93	3,00	1,02	115	115	1,00
	3	2,25	2,25	1,00	170	175	1,03
	4	2,50	2,46	0,98	65	70	1,08
	MÉDIA	2,75	2,76	1,00	128	126	1,00
	EP	0,24	0,25	0,01	24	22	0,04

A comparação entre os efeitos do modo de operação de cada transdutor, assim como o efeito do tempo de exposição no caso de um dos transdutores (TA), sobre a força e a frequência cardíaca foi efetuada por meio de análise de variância monofatorial. Além disso, utilizou-se análise de variância bifatorial para investigar a possível interação entre o tipo de transdutor e o modo de operação. Quando diferença significativa foi apontada na análise, as médias foram comparadas com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Um valor de

$p < 0,05$ foi estabelecido como indicativo de significância estatística. As análises foram realizadas com o programa MatLab[®] 7.0.1. (ANEXO 2).

Não foram observados efeitos significativos da aplicação de ultrassom pelo transdutor T1, durante 1 minuto, em qualquer dos modos de operação estudados. A análise de variância (Tabela VI.3) não detectou diferenças significativas entre os efeitos do diferentes modos de aplicação.

Tabela VI.3 – Análise de variância para força e frequência comparando modos FRP 3Hz CT 10%, FRP 5Hz CT 25%, CW 1' para o transdutor T1 (1 MHz).

ANOVA: FORÇA (3 modos para o transdutor T1)					
	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média dos Quadrados (SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T1</i>	0,00122	2	0,00061	1,87	0,22
<i>Erro</i>	0,00228	7	0,00033		
<i>Total</i>	0,00349	9			
ANOVA: FREQUÊNCIA (3 modos para o transdutor T1)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T1</i>	0,00184	2	0,00092	0,24	0,79
<i>Erro</i>	0,02705	7	0,00386		
<i>Total</i>	0,02889	9			

Os valores de tensão sistólica e frequência espontânea antes e ao final de um minuto de aplicação de alguns modos pulsados, além da operação contínua, dos transdutores ultrassônicos T3 e T6, encontram-se apresentados, respectivamente, nas Tabelas VI.4 e VI.5.

Tabela VI.4 – Força e frequência cardíaca pré- e pós-teste, para cada modo, usando o T3 (65,7 kHz). Os valores normalizados (NORM.) foram usados para a análise estatística.

MODO	CORAÇÃO	FORÇA PRÉ(gf)	FORÇA PÓS(gf)	FORÇA PÓS NORM.	FREQ. PRÉ(bpm)	FREQ. PÓS(bpm)	FREQ. PÓS NORM.
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 10 % - Duração: 1'	1	3,00	3,00	1,00	155	160	1,03
	2	3,04	3,00	0,99	130	130	1,00
	3	2,75	2,75	1,00	160	160	1,00
	4	2,20	2,25	1,02	60	55	0,92
	MÉDIA	2,75	2,75	1,00	126	126	0,99
	EP	0,19	0,18	0,01	23	25	0,02
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 50 % - Duração: 1'	1	3,08	3,08	1,00	160	155	0,97
	2	3,07	3,07	1,00	130	130	1,00
	3	3,13	3,17	1,01	172	180	1,05
	4	2,20	2,20	1,00	60	55	0,92
	MÉDIA	2,87	2,88	1,00	131	130	0,98
	EP	0,22	0,23	0,00	25	27	0,03
- Frequência de repetição de pulso: 5Hz - Ciclo de trabalho: 10 % - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	3,00	3,00	1,00	130	130	1,00
	3	2,92	2,92	1,00	150	165	1,10
	4	2,25	2,29	1,02	60	55	0,92
	MÉDIA	2,72	2,74	1,01	113	117	1,01
	EP	0,27	0,26	0,01	32	37	0,06
- Onda contínua - Duração: 1'	1	3,17	3,17	1,00	160	160	1,00
	2	3,11	3,07	0,99	130	125	0,96
	3	2,83	2,79	0,99	176	185	1,05
	4	2,29	2,29	1,00	60	65	1,08
	MÉDIA	2,85	2,83	0,99	132	134	1,02
	EP	0,20	0,20	0,00	26	26	0,03

Tabela VI.5 – Força e frequência cardíaca pré- e pós-teste, para cada modo, usando o T6 (102 kHz). Os valores normalizados (NORM.) foram usados para a análise estatística.

MODO	CORAÇÃO	FORÇA PRÉ(gf)	FORÇA PÓS(gf)	FORÇA PÓS NÓRM.	FREQ. PRÉ(bpm)	FREQ. PÓS(bpm)	FREQ. PÓS NÓRM.
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 10 % - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	3,00	3,00	1,00	150	150	1,00
	3	2,20	2,70	1,23	220	185	0,84
	4	2,33	2,33	1,00	60	55	0,92
	MÉDIA	2,51	2,68	1,08	143	130	0,92
	EP	0,29	0,22	0,09	53	45	0,05
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 50 % - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	2,93	2,93	1,00	150	150	1,00
	3	2,46	2,60	1,06	165	175	1,06
	4	2,25	2,25	1,00	60	60	1,00
	MÉDIA	2,55	2,59	1,02	125	128	1,02
	EP	0,23	0,23	0,02	38	40	0,02
- Frequência de repetição de pulso: 5Hz - Ciclo de trabalho: 50 % - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	3,00	3,00	1,00	140	140	1,00
	3	3,08	3,17	1,03	160	175	1,09
	4	2,42	2,42	1,00	60	60	1,00
	MÉDIA	2,83	2,86	1,01	120	125	1,03
	EP	0,24	0,26	0,01	35	39	0,04
- Onda contínua - Duração: 1'	1	-	-	-	-	-	-
	2	2,86	2,86	1,00	150	155	1,03
	3	2,70	2,54	0,94	215	160	0,74
	4	2,33	2,38	1,02	55	60	1,09
	MÉDIA	2,63	2,59	0,99	140	125	0,96
	EP	0,18	0,16	0,03	54	38	0,12

As Tabelas VI.6 e VI.7 mostram que não houve efeitos significativos para qualquer dos modos de operação descritos para o T3 e para o T6, respectivamente.

Tabela VI.6 - Análise de variância para força e frequência comparando modos FRP 3Hz CT 10%, FRP 3Hz CT 50%, FRP 5Hz CT 50%, CW 1' para o transdutor T3 (65,7 kHz).

ANOVA: FORÇA (4 modos para o transdutor T3)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T3</i>	0,00026	3	0,000086	1,03	0,42
<i>Erro</i>	0,00092	11	0,000083		
<i>Total</i>	0,00117	14			
ANOVA: FREQUÊNCIA (4 modos para o transdutor T3)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T3</i>	0,00368	3	0,00123	0,33	0,80
<i>Erro</i>	0,04032	11	0,00367		
<i>Total</i>	0,044	14			

Tabela VI.7 - Análise de variância para força e frequência comparando modos FRP 3Hz CT 10%, FRP 3Hz CT 50%, FRP 5Hz CT 50%, CW 1' para o transdutor T6 (102 kHz).

ANOVA: FORÇA (4 modos para o transdutor T6)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T6</i>	0,01313	3	0,00438	0,84	0,51
<i>Erro</i>	0,04173	8	0,00522		
<i>Total</i>	0,05487	11			
ANOVA: FREQUÊNCIA (4 modos para o transdutor T6)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor T6</i>	0,02523	3	0,00841	0,74	0,56
<i>Erro</i>	0,09067	8	0,01133		
<i>Total</i>	0,11589	11			

Os valores de tensão sistólica e frequência espontânea antes e após diferentes modos de aplicação de ultrassom com o transdutor TA estão apresentados na Tabela VI.8.

Tabela VI.8 – Força e frequência cardíaca pré- e pós-teste, para cada modo, usando o TA (1MHz). Os valores normalizados (NORM.) foram usados para a análise estatística.

MODO	CORAÇÃO	FORÇA BASAL	FORÇA FINAL	FORÇA FINAL NORM.	FREQ. BASAL	FREQ. FINAL	FREQ. FINAL NORM.
- Frequência de repetição de pulso: 3Hz - Ciclo de trabalho: 10 % - Duração: 1'	1	3,67	3,67	1,00	130	125	0,96
	2	2,86	2,86	1,00	120	115	0,96
	3	1,96	2,08	1,06	170	165	0,97
	4	2,25	2,25	1,00	60	55	0,92
	MÉDIA	2,69	2,72	1,02	120	115	0,95
	DP	0,76	0,72	0,03	45	45	0,02
	EP	0,38	0,36	0,02	23	23	0,01
- Frequência de repetição de pulso: 5Hz - Ciclo de trabalho: 25 % - Duração: 1'	1	#	#	#	#	#	#
	2	2,89	2,89	1,00	115	110	0,96
	3	2,25	2,46	1,09	150	140	0,93
	4	2,29	2,25	0,98	55	55	1,00
	MÉDIA	2,48	2,53	1,03	107	102	0,96
	DP	0,36	0,33	0,06	48	43	0,03
	EP	0,21	0,19	0,03	28	25	0,02
- Onda contínua - Duração: 1'	1	3,75	3,75	1,00	125	130	1,04
	2	2,86	2,79	0,98	120	120	1,00
	3	2,42	2,38	0,98	150	155	1,03
	4	2,20	2,08	0,95	60	70	1,17
	MÉDIA	2,81	2,75	0,98	114	119	1,06
	DP	0,69	0,73	0,02	38	36	0,07
	EP	0,34	0,36	0,01	19	18	0,04
- Onda contínua - Duração: 5'	1	3,58	3,83	1,07	130	124	0,95
	2	2,96	2,78	0,94	100	108	1,08
	3	2,50	2,17	0,87	140	155	1,11
	4	2,29	2,08	0,91	50	70	1,40
	MÉDIA	2,83	2,72	0,95	105	114	1,14
	DP	0,57	0,81	0,09	40	35	0,19
	EP	0,29	0,40	0,04	20	18	0,09
- Onda contínua - Duração: 10'	1	#	#	#	#	#	#
	2	2,96	2,64	0,89	100	120	1,20
	3	2,50	2,00	0,80	140	160	1,14
	4	2,29	1,88	0,82	50	60	1,20
	MÉDIA	2,58	2,17	0,84	97	113	1,18
	DP	0,34	0,41	0,05	45	50	0,03
	EP	0,20	0,24	0,03	26	29	0,02

Assim como observado com os demais transdutores, não foram detectados efeitos significativos sobre força ou frequência da aplicação do ultrassom por 1 minuto, exceto por uma pequena redução da frequência espontânea após aplicação no modo FRP 3Hz CT 10%. A análise de variância indicou diferença significativa na resposta cronotrópica aos diferentes modos de aplicação (Tabela VI.9): mais especificamente, os valores de frequência foram maiores após aplicação do modo contínuo, em comparação aos modos pulsados. No entanto, o teste de Bonferroni não detectou diferença significativa entre as médias (Fig. 6.11).

Tabela VI.9 – Análise de variância para força e frequência comparando modos FRP 3Hz CT 10%, FRP 5Hz CT 25%, CW 1' para o transdutor TA (1 MHz).

ANOVA: FORÇA (3 modos para o transdutor TA)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor TA</i>	0,00441	2	0,00221	1,63	0,26
<i>Erro</i>	0,01084	8	0,00136		
<i>Total</i>	0,01525	10			
ANOVA: FREQUÊNCIA (3 modos para o transdutor TA)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor TA</i>	0,02713	2	0,01357	5,18	0,04
<i>Erro</i>	0,02094	8	0,00262		
<i>Total</i>	0,04807	10			

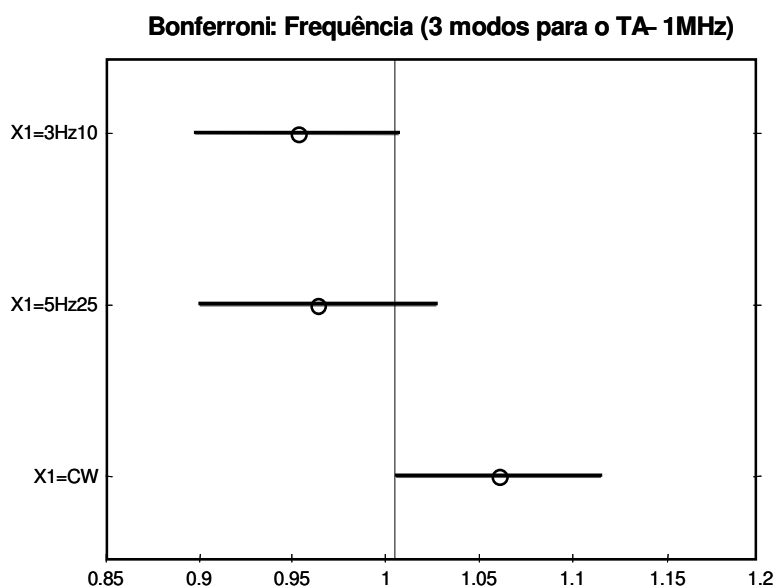


Fig. 6.11– Teste de Bonferroni. Comparação entre as respostas cronotrópicas aos diferentes modos de aplicação de ultrassom (pulsado com FRP 3Hz e ciclo de trabalho 10%; pulsado com FRP 5Hz e ciclo de trabalho 25%; onda contínua) usando o transdutor TA.

Por outro lado, analisando-se a influência da duração de aplicação do ultrassom em modo contínuo por esse mesmo transdutor, foi possível observar, ao final de aplicação prolongada, de 10 minutos, uma redução significativa de 16% da força sistólica, acompanhada de um aumento da frequência de 18% (Tabela VI.1). A análise de variância detectou um efeito significativo da duração da aplicação sobre a força, mas não sobre a frequência (Tabela VI.10), possivelmente devido à maior variabilidade desta última amostra de valores. O teste de Bonferroni mostrou redução da força sistólica após 10 minutos de aplicação em onda contínua com o transdutor TA ($p < 0,05$; Fig. 6.12). Como houve um aquecimento de aproximadamente 3°C, acredita-se que a redução da força tenha sido secundária ao aumento da frequência cardíaca.

Tabela VI.10 - Análise de variância para força e frequência comparando três tempos de aplicação (1, 5, e 10 minutos) em excitação contínua para o transdutor TA (1 MHz).

ANOVA: FORÇA (3 durações - onda contínua - transdutor TA)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor TA</i>	0,03635	2	0,01817	5,15	0,04
<i>Erro</i>	0,02822	8	0,00353		
<i>Total</i>	0,06456	10			

ANOVA: FREQUÊNCIA (3 durações - onda contínua - transdutor TA)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutor TA</i>	0,0261	2	0,01305	0,82	0,47
<i>Erro</i>	0,1275	8	0,01594		
<i>Total</i>	0,1536	10			

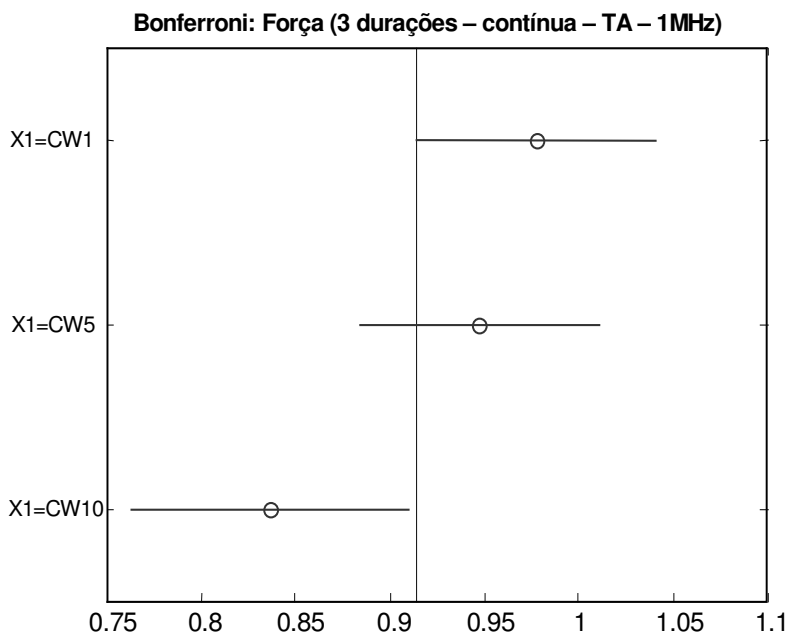


Fig. 6.12 – Teste de Bonferroni. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os efeitos da aplicação do TA por 1 minuto e por 10 minutos sobre a tensão sistólica.

A análise de variância bifatorial (Tabela VI.11) não apontou diferenças dependentes do tipo de transdutor ou do modo de aplicação sobre a força desenvolvida e a

frequência espontânea dos corações isolados. Também não foi detectada interação entre os fatores transdutor e modo de operação.

Tabela VI.11 – Análise de variância bifatorial para força e frequência. Fatores: transdutores (TA, T1, T3, T6) e modo de aplicação (FRP 3Hz CT 10%, FRP 5Hz CT 25%/50%, CW).

ANOVA BIFATORIAL: FORÇA (4 transdutores; 3 modos)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutores (T)</i>	0,00629	3	0,0021	1,14	0,35
<i>Modos (M)</i>	0,00758	2	0,00379	2,06	0,15
<i>Interação (TxM)</i>	0,01308	6	0,00218	1,19	0,34
<i>Erro</i>	0,05329	29	0,00184		
<i>Total</i>	0,07781	40			
ANOVA BIFATORIAL: FREQUÊNCIA (4 transdutores; 3 modos)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
<i>Transdutores (T)</i>	0,01423	3	0,00474	0,82	0,49
<i>Modos (M)</i>	0,01141	2	0,00571	0,99	0,38
<i>Interação (TxM)</i>	0,03906	6	0,00651	1,13	0,37
<i>Erro</i>	0,16768	29	0,00578		
<i>Total</i>	0,23244	40			

VI. 3. DISCUSSÃO

Dos conjuntos de parâmetros acústicos aplicados nos experimentos *in vitro*, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os efeitos da aplicação do TA (1MHz) por 1 minuto e por 10 minutos sobre a força. Há tendência à queda de força com o aumento do tempo de aplicação do TA em excitação contínua. Cabe ressaltar que, após 10 minutos de exposição contínua, com aplicação de 52Vpp, observou-se aumento de temperatura de aproximadamente 3°C, de forma que a resposta observada provavelmente decorre de efeito térmico do ultrassom. Esse resultado pode não ter aplicação em terapia em cardiologia, mas serve de alarme para que fisioterapeutas tenham atenção à exposição contínua para tratar músculos próximos ao coração, já que o aquecimento observado aqui é menor que o decorrente de exposição típica de fisioterapia (SÁ *et al.*, 2008).

Para os outros conjuntos de parâmetros acústicos estudados, o ultrassom não interferiu na atividade cardíaca. No entanto, no primeiro experimento preliminar *in vitro* foram observados efeitos pró-arrítmicos isolados pelo uso do ultrassom com frequência de 65,7kHz, aplicando-se 25Vpp em excitação contínua.

A Fig. 6.13 apresenta as três câmaras de perfusão construídas para a montagem experimental do coração isolado. As câmaras, confeccionadas de acrílico, são cilíndricas e possuem a base removível, contendo a cânula através da qual flui a solução nutritiva (Fig. 6.13.a). Após a canulação da aorta, a base e o corpo da câmara são conectados por meio de ranhuras em rosca presentes nas duas peças, ou por parafusos. A parede externa da câmara é plana em um dos lados, para acoplamento do transdutor ultrassônico, e há fendas cilíndricas no lado interno da parede para a eventual colocação de eletrodos, caso haja necessidade de estimulação elétrica, o que raramente ocorreu.

A câmara convencional, inteiramente de acrílico (Fig. 6.13.b), foi usada nos experimentos preliminares. A seguir, a câmara foi modificada de modo que a parede plana de acrílico foi removida e substituída por uma janela acústica de acetato (Fig. 6.13.c), tendo sido também introduzido um refletor de aço (Fig. 6.13.d). As câmaras com janelas acústicas foram usadas nos experimentos seguintes, por se entender que mais energia chegaria ao seu interior, o que foi confirmado pela observação de maior aquecimento da água, medido com termopar, durante a aplicação prolongada de ultrassom. No entanto, a câmara de acrílico sem janela acústica (câmara 1), usada no primeiro experimento preliminar, pode ter contribuído para a observação de efeitos pró-arrítmicos isolados pelo uso do T3 (65,7kHz). A parede da câmara 1, plana por fora e côncava por dentro, pode funcionar como uma lente capaz de concentrar a energia ultrassônica em algum ponto em seu interior.

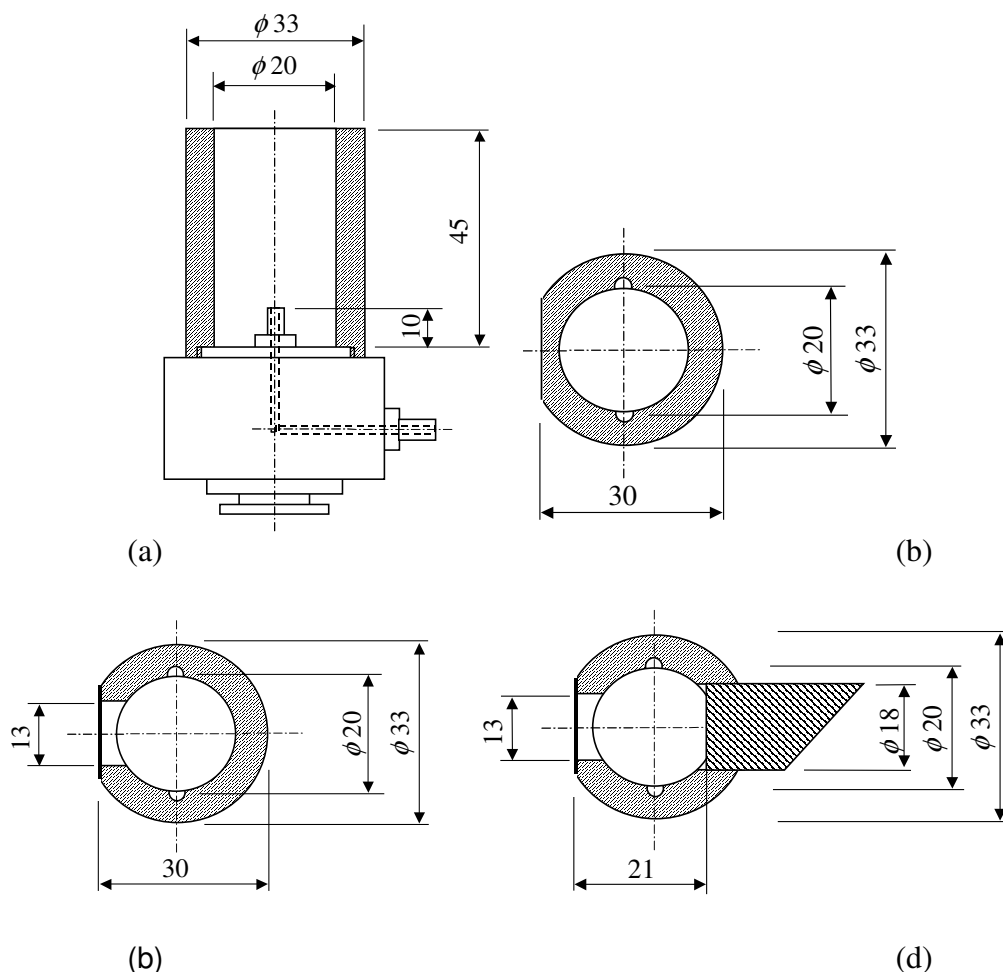


Fig. 6.13 – Câmaras de perfusão construídas. Medidas em mm. (a) Vista lateral - corpo da câmara rosqueado na base. (b) Vista superior - câmara de acrílico. (c) Vista superior - câmara de acrílico com janela acústica de acetato. (d) Vista superior - câmara de acrílico com janela acústica de acetato e refletor perfeito de aço.

Com o intuito de se verificar a influência de cada câmara de perfusão sobre o campo ultrassônico gerado pelo transdutor T3 (65,7kHz), realizou-se a simulação dos campos pelo método dos elementos finitos (ANSYS/Multiphysics), usando-se um programa escrito pelo Prof. Dr. Flávio Buiochi, da Escola Politécnica da USP. Optou-se por um modelo 2D, considerando-se a seção transversal da câmara pertencente ao plano azimutal do feixe irradiado pelo transdutor. Após definição da geometria e dos materiais, procedeu-

se à escolha dos elementos para gerar a malha do modelo, sendo *PLANE42* para elementos de estrutura (câmara) e *FLUID29* para elementos de fluido e elementos de interface fluido-estrutura. Fez-se a análise harmônica, presumindo-se estado plano de deformação. Os resultados das análises permitem a visualização das distribuições de pressão produzida por cada transdutor em cada uma das câmaras.

A Fig. 6.14 mostra que o transdutor T3 (65,7kHz) gera, sobre o coração isolado colocado no centro da câmara 1, uma distribuição de pressão que chama atenção pela simetria, como se houvessem pequenas fontes pontuais de pressão em torno da câmara. Os campos produzidos por esse mesmo transdutor nas câmaras 2 (Fig. 6.15) e 3 (Fig. 6.16) não reproduzem tal distribuição circular. Cabe ressaltar que o primeiro experimento preliminar em que se observaram efeitos pró-arrítmicos foi conduzido na câmara 1.

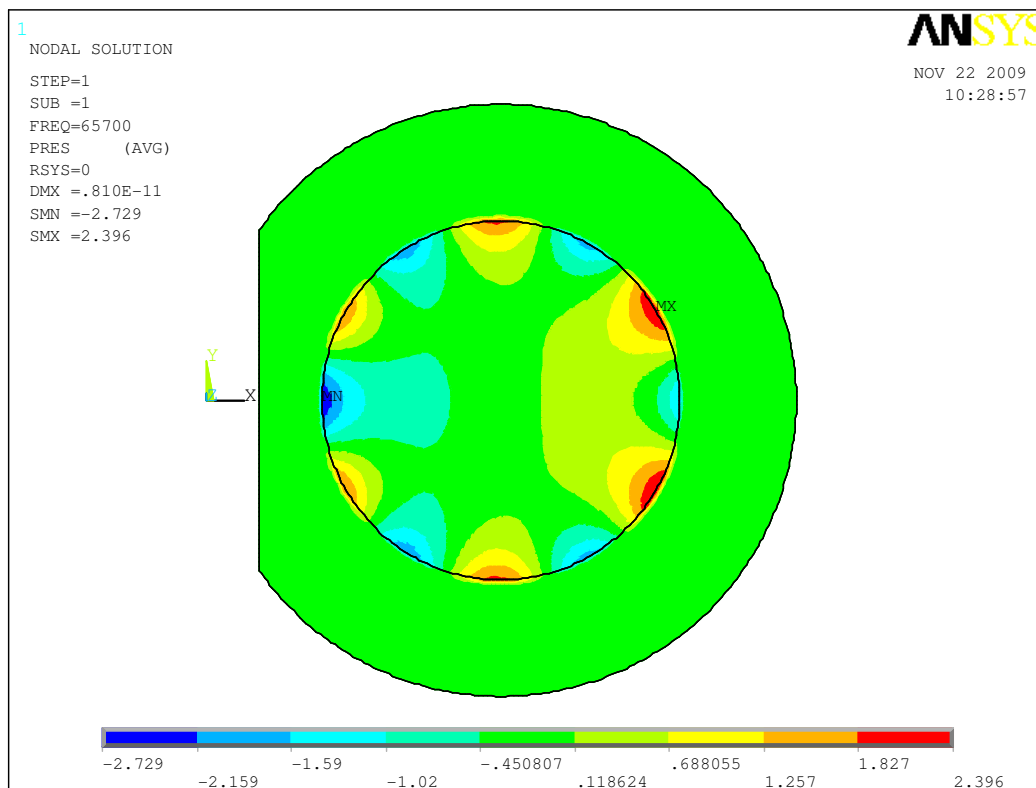


Fig. 6.14 – Simulação do campo acústico produzido pelo transdutor T3 na câmara 1.

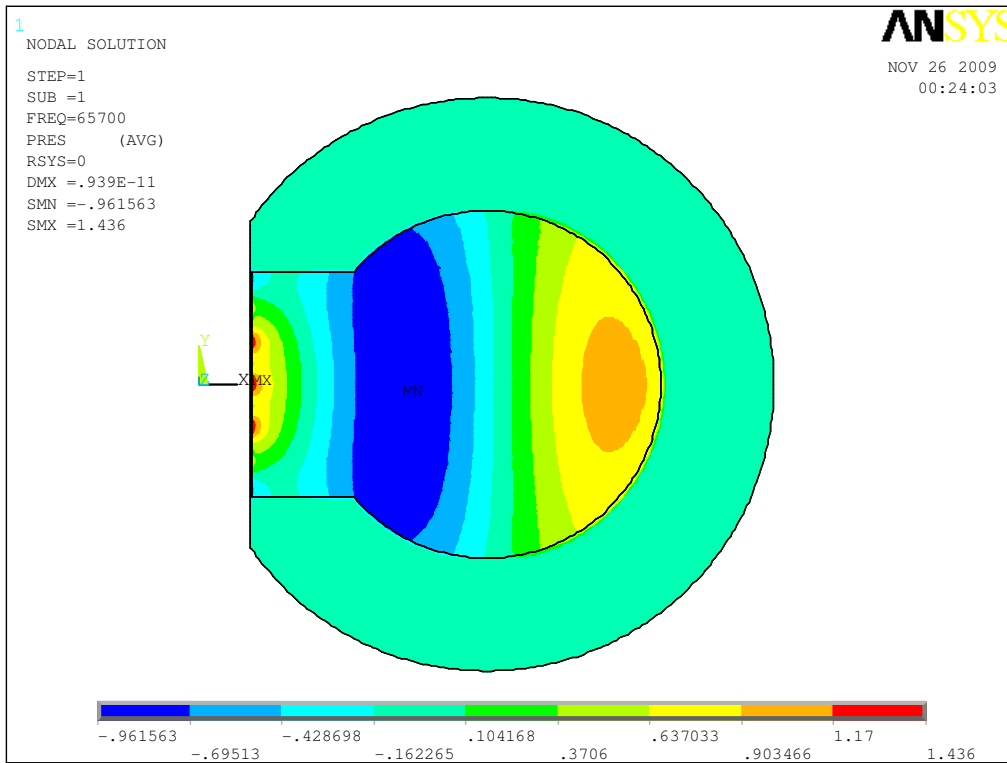


Fig. 6.15 – Simulação do campo acústico produzido pelo transdutor T3 na câmara 2.

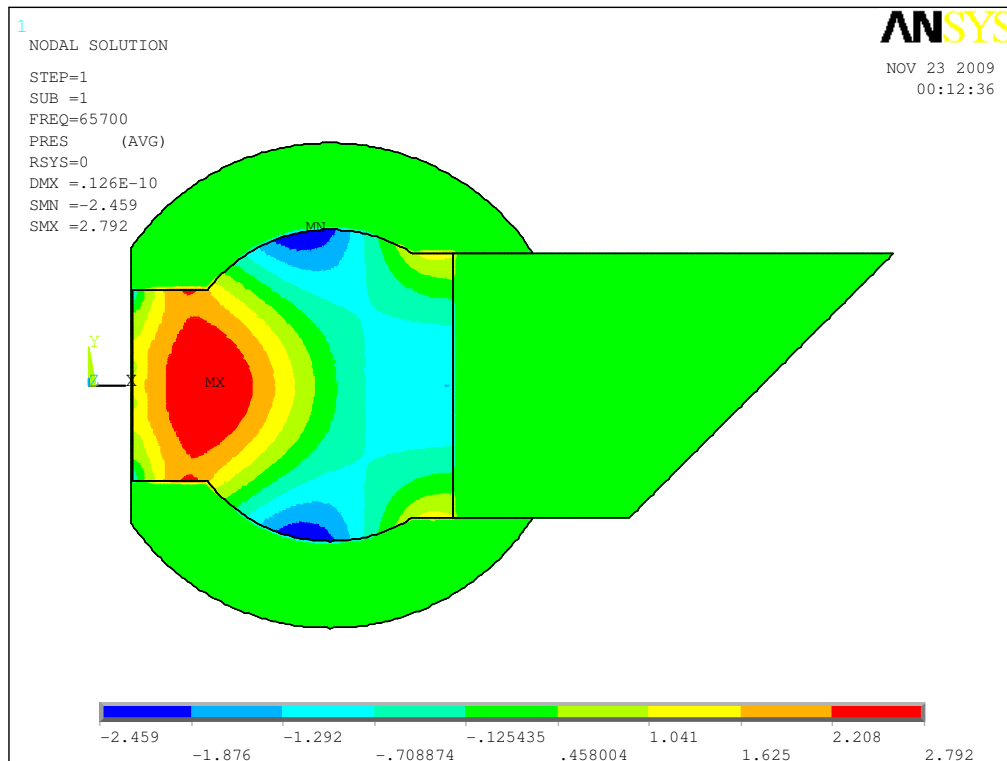


Fig. 6.16 – Simulação do campo acústico produzido pelo transdutor T3 na câmara 3.

A tensão aplicada ao transdutor T3 (65,7kHz) nos experimentos *in vitro* pode ter sido insuficiente para a repetitividade do efeito observado. Ao se aumentar a tensão de excitação em experimentos *in vivo*, provocou-se uma queimadura circular, de dimensões idênticas às da ponta do transdutor, na pele e no tecido subjacente, sem chegar a atingir o coração. A geometria do transdutor interferiu nessa ocorrência, uma vez que há concentração de energia na ponta do amplificador mecânico. No entanto, esse transdutor continua sendo uma alternativa viável para a realização de experimentos *in vitro*, já que nesse caso, a ponta do amplificador encosta na superfície da câmara e produz um campo acústico interessante em seu interior.

CAPÍTULO VII

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Apesar de experimentos *in vitro* apresentarem algumas vantagens, como a minimização da influência neural e controle do meio extracelular, nem sempre seus resultados podem ser extrapolados para uma situação *in vivo*. A aplicação *in vitro* apresenta algumas limitações, como a influência da câmara de perfusão e a ausência da relevante resposta homeostática. Por exemplo, aquecer um tecido biológico provoca vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, o qual auxilia o resfriamento. Além do aumento na temperatura de tecidos expostos a aquecimento *in vitro* ser maior, a probabilidade de ocorrência de cavitação *in vitro* também é muito maior (BAKER *et al.*, 2001). Estas foram as razões que levaram ao estudo da aplicação de ultrassom ao tecido cardíaco *in vivo*, os quais foram conduzidos no *Bioacoustics Research Laboratory* da *University of Illinois at Urbana-Champaign*, E.U.A..

VII.1. METODOLOGIA

VII. 1. 1. Animais

As condições experimentais foram aprovadas pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da *University of Illinois*, E.U.A. (protocolo número 10104, ANEXO 3). Foram usados ratos Sprague-Dawley, fêmeas, de aproximadamente 3 meses de idade. Os ratos foram fornecidos pela *Harlan Laboratories* (Indianapolis, IN) e 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*.

Os animais foram anestesiados com isoflurano 5% para a indução da anestesia inalatória utilizando uma câmara anestésica, e depois 1,5 a 2% de isoflurano para a manutenção da anestesia via máscara facial. O nível de anestesia foi monitorado por reflexo plantar e frequência respiratória, uma vez que o isoflurano é um depressor respiratório. É importante ressaltar que, durante a anestesia com isoflurano, a contratilidade do miocárdio é mantida e o ritmo cardíaco é estável, exceto pela eventual ocorrência de taquicardia (EGER, 1984; DALE & BROWN, 1987).

A pele sobre a região torácica foi depilada para maximizar a transmissão acústica. Os ratos foram colocados em uma plataforma com temperatura controlada em decúbito dorsal para a estimulação por ultrassom. Monitoramento de temperatura corporal, frequências respiratória e cardíaca, e eletrocardiograma (ECG) foi feito desde antes da exposição do coração ao ultrassom até após o seu término.

A eutanásia foi evitada sempre que possível. Apenas dois animais foram sacrificados. A eutanásia foi realizada pela inalação de CO₂ por 5 minutos sob anestesia. Os corações foram removidos, fixados e processados para avaliação histológica.

VII. 1. 2. Montagem experimental

O diagrama de blocos é apresentado na Fig. 7.1. A montagem experimental é mostrada na Fig. 7.2, sendo o sistema de anestesia exibido separadamente na Fig. 7.3. A plataforma em que o rato era posicionado continha quatro eletrodos de ECG (Fig. 7.4), os quais eram revestidos com gel para fazer contato com as patas. Após anestesiado, o animal era colocado sobre a plataforma, conectada a uma caixa de controle THM 150. Uma sonda retal para medição de temperatura foi utilizada. Os sinais de temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória e ECG eram exibidos na tela. O transdutor de 1MHz foi excitado por um gerador de função (Agilent 33250A) conectado a um amplificador de RF (ENI A 150).

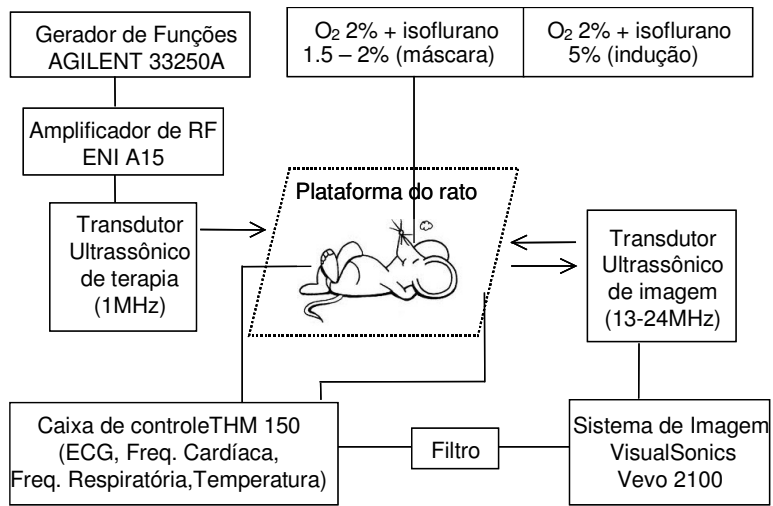


Fig. 7.1 – Diagrama de blocos da montagem experimental.



Fig. 7.2 – Montagem experimental contendo gerador de sinais (1), amplificador de RF (2), transdutor de ultrassom de terapia (3), transdutor de ultrassom de imagem (4), sistema de ultrassom VisualSonics (5), e plataforma cirúrgica (6), onde era colocado o rato.



Fig. 7.3 – Sistema de anestesia contendo isoflurano, cilindro de oxigênio, dois filtros, sendo um ligado à câmara de acrílico e outro conectado à máscara facial.

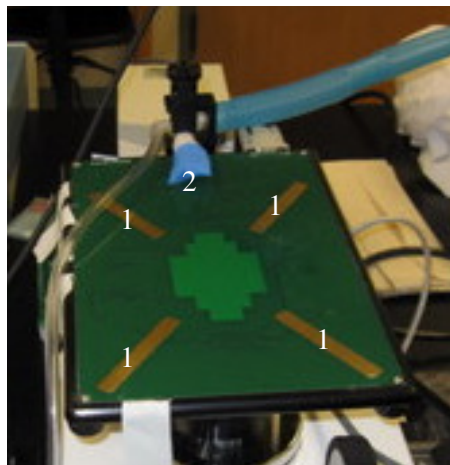


Fig. 7.4 – Plataforma para posicionamento do rato contendo eletrodos (1) para aquisição do sinal de ECG. Máscara facial (2) para manutenção da anestesia.

Além de apresentar os dados fisiológicos na tela, o sistema de imagem de ultrassom de alta frequência VisualSonics Vevo 2100 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. Um pós-processamento foi feito traçando-se quatro linhas sobre a imagem em modo-M (Fig. 7.5). Isso é usado pelo programa para calcular as variáveis hemodinâmicas, como, por exemplo, a fração de ejeção.

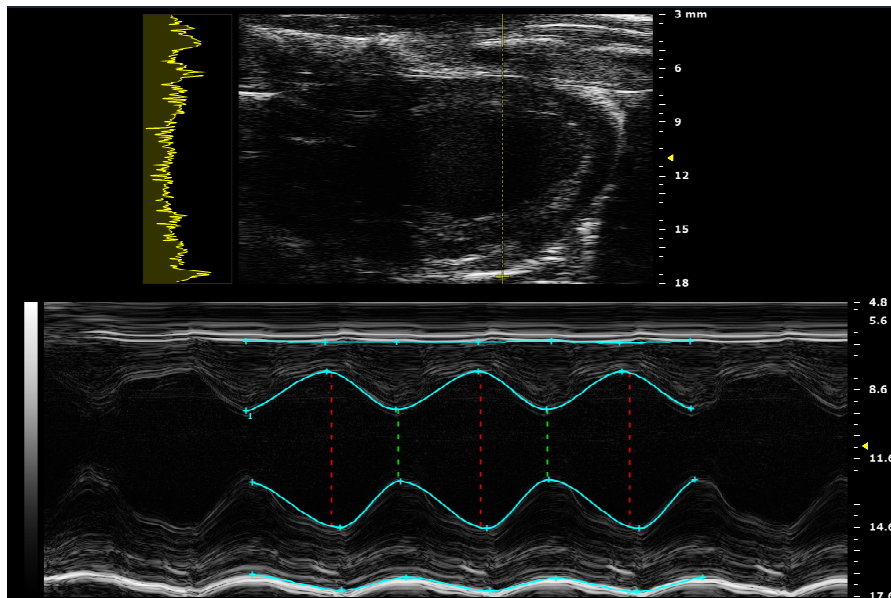


Fig. 7.5 – Tela do VisualSonics: imagens em modo-B e modo-M com traçado para cálculo das variáveis fisiológicas.

VII. 1. 3. Sequências experimentais

Estudos preliminares *in vivo* mostraram que o transdutor de 65,7kHz não funcionava bem para esse tipo de experimento, uma vez que produzia lesões na pele e musculatura esquelética subjacente, antes de provocar qualquer efeito no coração. Provavelmente, a limitação do transdutor em questão resultou de sua geometria, e não de

sua frequência de ressonância, já que a literatura relata que o ultrassom com frequência de 70kHz (muito próxima) demonstrou ser capaz de funcionar como marca-passo em porcos com bradicardia induzida por hipóxia, de forma a restabelecer a frequência cardíaca fisiológica (TOWE & RHO, 2005).

Como a literatura relata que o uso de ultrassom contínuo de 1MHz e alta intensidade (até $I_{SATA}=2,9W/cm^2$) é capaz de produzir efeito inotrópico positivo (KUMA *et al.*, 2006), um estudo preliminar foi conduzido para checar se também ocorreria algum efeito cronotrópico. Aplicando-se ultrassom de 1MHz, onda contínua, pressão de rarefação de 0,6MPa (equivalente à $I_{SATA} =1,3W/cm^2$), durante 1 minuto, nenhum efeito foi observado. No entanto, houve grande aumento de temperatura quando o coração foi exposto a 1,2MPa ($I_{SATA} =5,2W/cm^2$) por 1 minuto. O animal sofreu danos térmicos, foi sacrificado, e o coração foi submetido à avaliação histológica.

De forma a minimizar efeitos térmicos, dois esquemas pulsados foram propostos: (a) frequência de repetição de pulso única, ligeiramente acima da frequência cardíaca, com ciclo de trabalho variável (1%, 5% e 10% por 30s cada), com pressões de até 1MPa; (b) ciclo de trabalho de aproximadamente 1% com frequência de repetição de pulso variável (começando ligeiramente acima da frequência cardíaca e reduzindo em 1Hz a cada 10s, totalizando 30s), com pressões de até 3MPa. Começar ligeiramente abaixo da frequência cardíaca e tentar aumentá-la não resultou em efeitos em estudos preliminares. Cada esquema foi testado em quatro animais, totalizando oito animais. Como não houve alterações visíveis no ECG, optou-se por permitir a recuperação dos animais.

A sequência de frequência de repetição de pulso variável aparentemente resultou em efeito cronotrópico negativo. Assim, mais seis animais (totalizando dez animais) foram expostos à mesma sequência, que fica mais clara na Tabela VII.1. Cada frequência de repetição do pulso dura 10s, totalizando 30s para cada pressão de saída (2MPa, 2,5MPa, 3MPa). O ciclo de trabalho usado foi em torno de 1%, o que significa que, para uma sequência de 6Hz, 5Hz e 4Hz como frequências de repetição de pulso (ou seja, 167ms, 200ms e 250ms como períodos de repetição de pulso, correspondentemente), um

pulso de 2ms foi usado. Foi permitida a recuperação dos animais, com exceção de um que foi sacrificado para avaliação histológica. Outros cinco animais foram utilizados como grupo controle, nos quais foram realizados todos os procedimentos do grupo experimental, exceto pela aplicação do ultrassom.

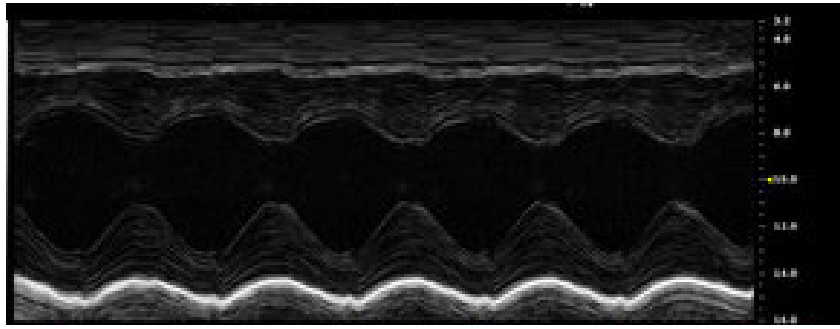
Tabela VII.1 – Sequência de estimulação ultrassônica, usando frequência de repetição de pulso variável, durante 10s cada, totalizando 30s para cada pressão de saída.

APLICAÇÃO DE ULTRASSOM – 1MHz					AQUISIÇÃO
Tensão aplicada	Pressão de saída	Ciclo de Trabalho	Frequência de Repetição de Pulso	Duração da Exposição	
					modo-M 1
					ECG1 – 30s
150V _{pp}	p _r =2MPa	~1%	ligeiramente acima da FC	10s	ECG2 – 30s
		1%	menos 1Hz	10s	
		~1%	menos 1Hz	10s	
					ECG3 – 30s
200V _{pp}	p _r =2,5MPa	~1%	ligeiramente acima da FC	10s	ECG4 – 30s
		1%	menos 1Hz	10s	
		~1%	menos 1Hz	10s	
					ECG5 – 30s
250V _{pp}	p _r =3MPa	~1%	ligeiramente acima da FC	10s	ECG6 – 30s
		1%	menos 1Hz	10s	
		~1%	menos 1Hz	10s	
					ECG7 – 30s
					modo-M 2
					modo-M 3

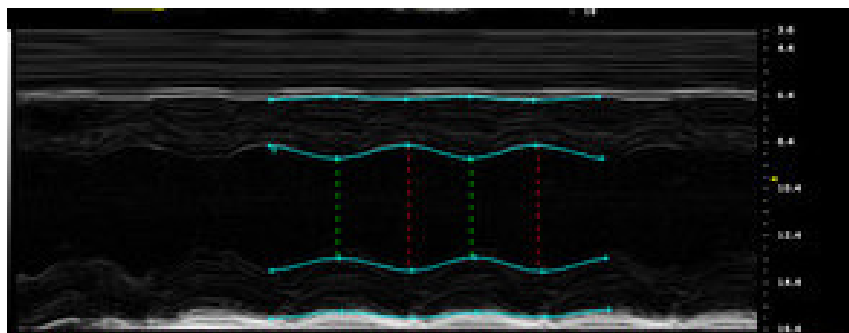
VII.2. RESULTADOS

VII. 2. 1. Excitação contínua

O levantamento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, realizado sobre a imagem modo-M (Fig. 7.6), indica uma redução de 84% para 42% após a aplicação de ultrassom contínuo, 1,2MPa ($I_{SATA}=5,2W/cm^2$), por 1 minuto. A avaliação histológica, apresentada na Fig. 7.7, revela a ocorrência de danos, evidenciados pela presença de desorganização celular e perda de núcleos.

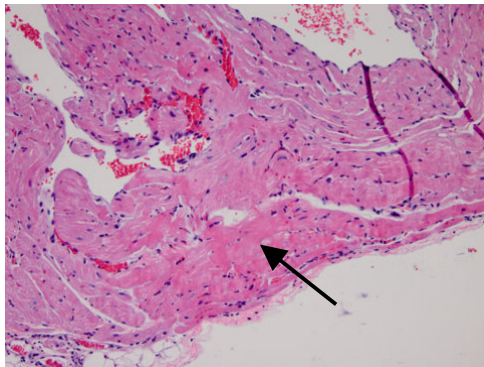


(a)

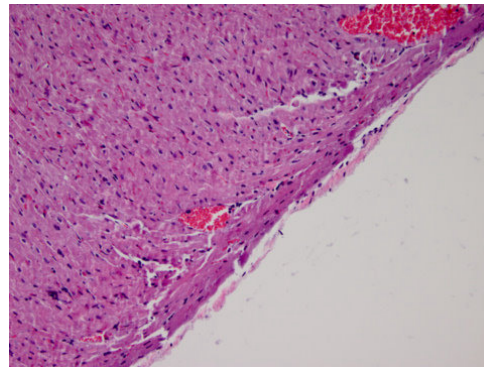


(b)

Fig. 7.6 – Modo-M (a) antes (fração de ejeção de 84%) e (b) depois (fração de ejeção de 42%) da exposição ao ultrassom contínuo.



(a)



(b)

Fig. 7.7 – Avaliação histológica (aumento 20x) (a) após exposição à onda contínua, revelando a ocorrência de danos teciduais pela desorganização e perda de núcleos (seta), e (b) após esquema pulsado, sem evidências de danos teciduais.

VII. 2. 2. Temperatura

Medições de temperatura foram realizadas em um tanque contendo água destilada degaseificada. Um aquecedor foi utilizado para que a temperatura da água atingisse 32°C. Um termopar (Omega HSTC-TT-T-24S-36.SMPW-CC) foi colocado 1mm afastado da face do transdutor de 1MHz. O termopar foi conectado a um dispositivo de medição (National Instruments USB-TC01) para aquisição contínua. O transdutor foi excitado pelo mesmo gerador de sinal e amplificador de RF utilizado para os experimentos cardíacos.

Houve aumento de 5,4°C e de 20°C, respectivamente, para exposições contínuas de 0,6MPa and 1,2MPa (Fig. 7.8), o que levou à ocorrência de danos térmicos no tecido. A Fig. 7.9 mostra que o aumento de temperatura decorrente da aplicação contínua de ultrassom com amplitude de 25V_{pp} é maior que o causado por um ciclo de trabalho de 5% com amplitude quatro vezes maior. Quanto ao ciclo de trabalho de aproximadamente 1% a uma amplitude muito maior (250V_{pp}), o aumento de temperatura é desprezível para aplicações *in vivo* (Fig. 7.10).

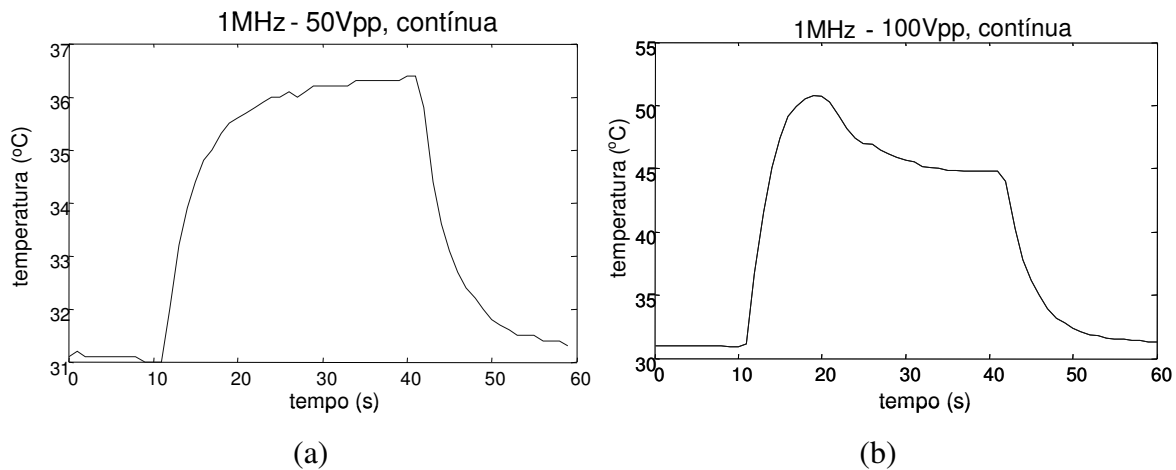


Fig. 7.8: A aplicação preliminar de ultrassom contínuo resultou em aumento de temperatura de (a) 5,4°C e (b) 20°C. A exposição contínua combinada a altas potências acarreta danos térmicos.

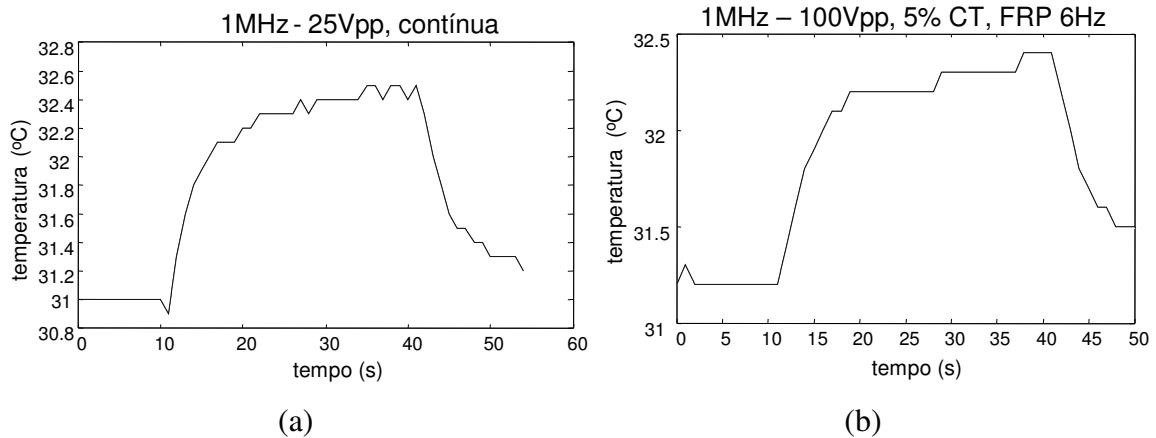


Fig. 7.9: Aumento de temperatura provocado por (a) onda contínua (1,5°C) e (b) *bursts* de ciclo de trabalho 5% a uma amplitude de excitação quatro vezes maior (1,2°C).

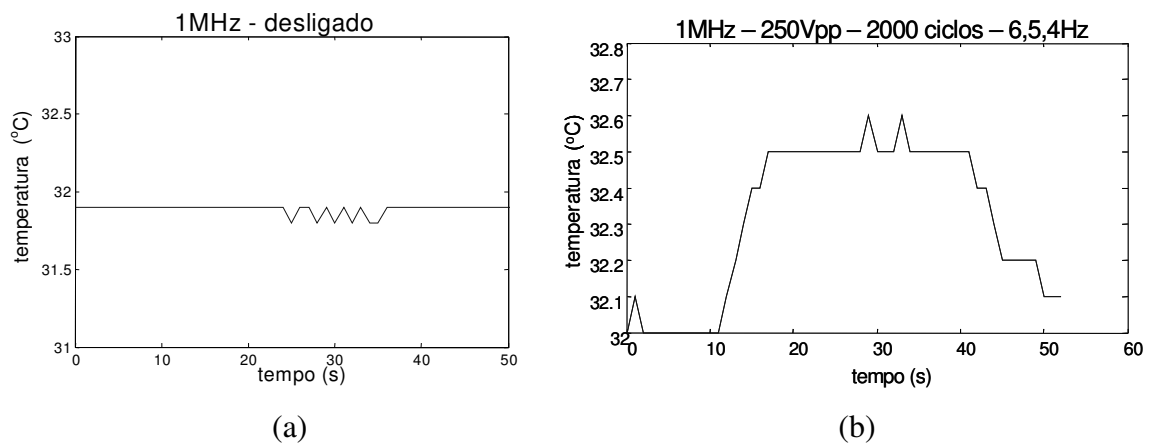
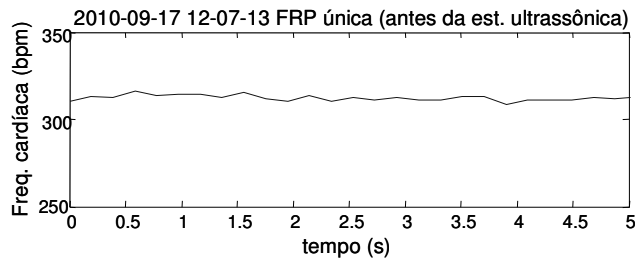


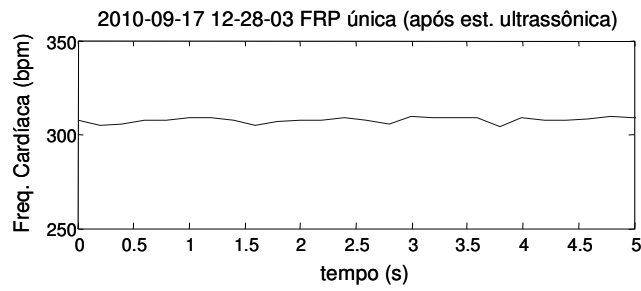
Fig. 7.10 – Levantamento térmico usando o transdutor ultrassônico de 1MHz (a) desligado e (b) excitado por 250V_{pp} (pressão de rarefação de 3MPa), com ciclo de trabalho de aproximadamente 1% e frequência de repetição de pulso variável. As variações de temperatura foram de, respectivamente, 0,1°C e 0,6°C.

VII. 2. 3. Frequências de repetição de pulso fixa e variável

As Figs. 7.11 e 7.12 mostram exemplos do monitoramento da frequência cardíaca antes e após estimulação ultrassônica com frequência de repetição de pulso única e variável, respectivamente. No segundo caso, a redução da frequência cardíaca é visível.

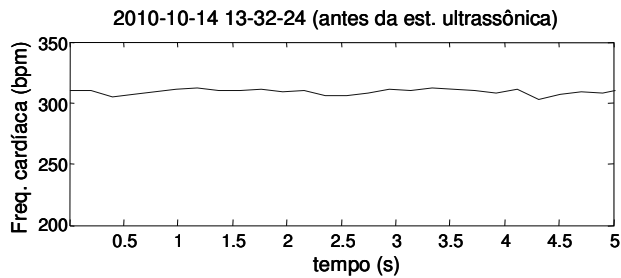


(a)

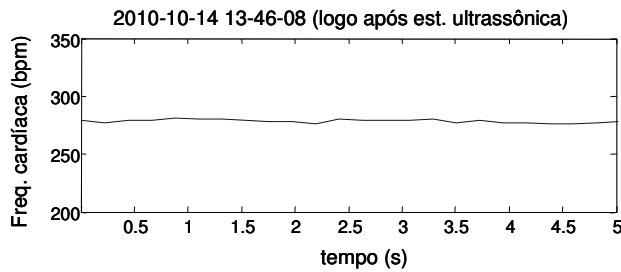


(b)

Fig. 7.11 – Monitoramento da frequência cardíaca (a) antes e (b) após estimulação ultrassônica usando frequência de repetição de pulso única.



(a)



(b)

Fig. 7.12 – Monitoramento da frequência cardíaca (a) antes e (b) após estimulação ultrassônica usando frequência de repetição de pulso variável. Ocorreu redução da frequência cardíaca logo após estimulação por ultrassom.

Para cada esquema pulsado (frequência de repetição de pulso única e variável), os valores obtidos logo após a estimulação ultrassônica foram normalizados pelos valores pré-estimulação. A Tabela VII.2 apresenta esses números como uma porcentagem do valor inicial.

Tabela VII.2 – Valores normalizados de variáveis fisiológicas para as duas sequências de aplicação pulsada - frequência de repetição de pulso (FRP) fixa e variável - expressos como média e erro padrão (EP) para n=4.

Parâmetro	FRP ÚNICA		FRP VARIÁVEL	
	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP
Frequência cardíaca	98,9%	0,26%	81,8%	3,98%
Frequência respiratória	86,5%	6,56%	88,3%	8,56%
Temperatura	95,4%	2,54%	96,5%	0,85%

O teste t de Student foi realizado para checar se havia diferença nas frequências respiratória e cardíaca entre os dois grupos, usando-se os valores normalizados. Os resultados expostos na Tabela VII.3 mostram que não houve alteração na frequência respiratória, a qual caiu durante os experimentos em ambos os grupos, provavelmente como resultado da inalação de isoflurano. Por outro lado, há diferença ($p < 0,05$) na frequência cardíaca entre os grupos, como apresenta a Tabela VII.4. Os valores absolutos da frequência cardíaca, antes e após a realização dos experimentos com frequência de repetição de pulso variável, foram usados para a realização de um teste t pareado, que mostrou uma queda significativa ($p < 0,05$) na frequência cardíaca (Tabela VII.5).

Possíveis alterações na contratilidade cardíaca dentro do grupo exposto ao ultrassom com frequência de repetição de pulso variável foram investigadas por meio da fração de ejeção e do volume diastólico final. Tais parâmetros foram comparados pelo teste t pareado, usando-se os valores absolutos antes e após a estimulação ultrassônica. A ausência de diferença (Tabela VII.6) é compatível com provável ausência de efeito contrátil importante sobre o tecido.

Tabela VII.3 – Teste t de Student comparando os efeitos da aplicação de ultrassom com frequência de repetição de pulso (FRP) única e variável sobre a frequência respiratória (FR). Não houve diferença significativa.

Duas amostras – variâncias equivalentes	FR- FRP única	FR- FRP variável
Média	0,87	0,88
Variância	0,02	0,03
Observações	4	4
Variância agrupada	0,02	
Hipótese da diferença de média	0	
GL	6	
Stat t	-0,16	
P(T<=t) bi-caudal	0,87	
t crítico bi-caudal	2,45	

Tabela VII.4 – Teste t de Student comparando os efeitos da aplicação de ultrassom com frequência de repetição de pulso (FRP) única e variável sobre a frequência cardíaca (FC). Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupos.

Duas amostras – variâncias diferentes	FC- FRP única	FC- FRP variável
Média	0,99	0,82
Variância	0,00	0,01
Observações	4	4
Hipótese da diferença de média	0	
GL	3	
Stat t	4,28	
P(T<=t) bi-caudal	0,02	
t crítico bi-caudal	3,18	

Tabela VII.5 – Teste t pareado comparando a frequência cardíaca (FC) antes e após a aplicação de ultrassom com frequência de repetição de pulso (FRP) variável. Houve diferença significativa ($p < 0,05$).

Teste t de Student pareado	FC antes - FRP variável	FC depois - FRP variável
Média	333,27	272,09
Variância	327,13	471,68
Observações	4	4
Correlação de Pearson	-0,01	
Hipótese da diferença de média	0	
GL	3	
Stat t	4,31	
P(T<=t) bi-caudal	0,02	
t crítico bi-caudal	3,18	

Tabela VII.6 – Testes t pareados comparando a fração de ejeção (FE) e o volume diastólico final (VDF) do ventrículo esquerdo antes e após a aplicação de ultrassom com frequência de repetição de pulso (FRP) variável. Não houve diferença significativa.

Teste t de Student pareado	FE antes - FRP variável	FE depois - FRP variável	VDF antes - FRP variável	VDF depois - FRP variável
Média	82,33	83,41	173,67	182,81
Variância	46,51	40,52	991,31	510,26
Observações	4	4	4	4
Correlação de Pearson	0,99		0,86	
Hipótese da diferença de média	0		0	
GL	3		3	
Stat t	-2,05		-1,10	
P(T<=t) bi-caudal	0,13		0,35	
t crítico bi-caudal	3,18		3,18	

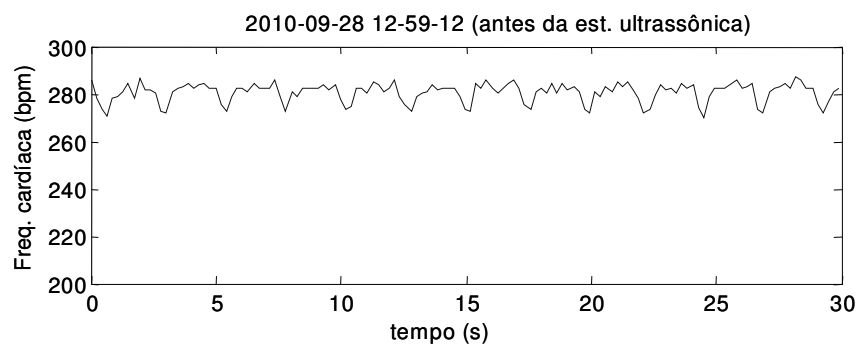
VII. 2. 4. Frequência de repetição de pulso variável e grupo controle

Uma vez demonstrado que a frequência de repetição de pulso variável resultava em efeito cronotrópico negativo, realizaram-se mais testes com a sequência experimental proposta, além de experimentos controles. Os valores iniciais para as variáveis fisiológicas do grupo experimental e do grupo controle estão expostos na Tabela VII.7.

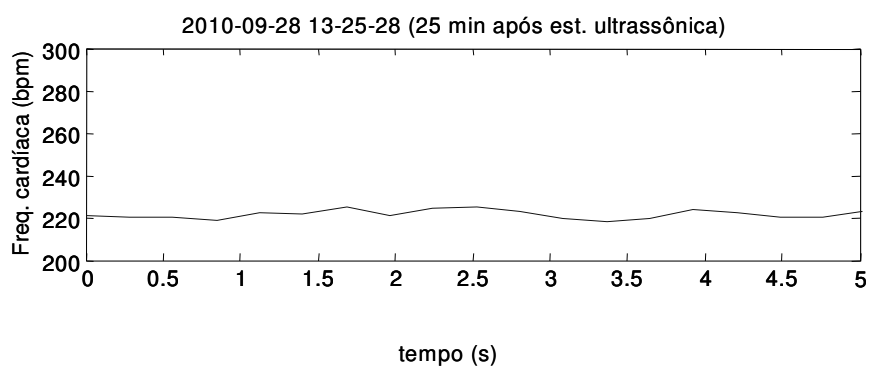
Tabela VII.7 – Valores iniciais para as variáveis fisiológicas expressas como média e erro padrão (EP) para o grupo experimental (n=10) e para o grupo controle (n=5).

PARÂMETRO	UNIDADE	Experimental (n=10)		Controle (n=5)	
		MÉDIA	EP	MÉDIA	EP
Frequência cardíaca	bpm	344,92	8,25	353,17	8,06
Débito cardíaco	mL/min	49,55	2,00	56,72	3,24
Volume ejetado	µL	143,80	4,51	160,56	8,65
Fração de ejeção	%	83,71	2,05	78,10	2,43
Volume diastólico final	µL	172,98	7,55	206,12	11,63
Volume sistólico final	µL	29,18	4,73	45,56	6,50
Encurtamento	%	54,15	2,32	47,96	2,34
Diâmetro diastólico final	mm	5,90	1,86	6,36	0,16
Diâmetro sistólico final	mm	2,70	0,86	3,31	0,19
Frequência respiratória	1/min	42,10	2,82	44,00	2,35
Temperatura	°C	33,22	0,50	33,82	0,39

Ocorreu queda na frequência cardíaca de todos os dez animais submetidos à sequência ultrassônica proposta. A Fig. 7.13 mostra um exemplo de um monitoramento da frequência cardíaca antes (cerca de 280 bpm) e 25 minutos após (aproximadamente 220 bpm) a estimulação por ultrassom.



(a)



(b)

Fig. 7.13 – Monitoramento da frequência cardíaca (a) antes e (b) 25 minutos após estimulação ultrassônica de 1MHz com frequência de repetição de pulso variável.

Nesse caso, a queda de frequência cardíaca ocorreu durante a aplicação de ultrassom, como mostrado na Fig. 7.14. Em alguns outros casos, a diminuição da frequência cardíaca foi observada apenas após o tratamento com ultrassom ter sido interrompido.

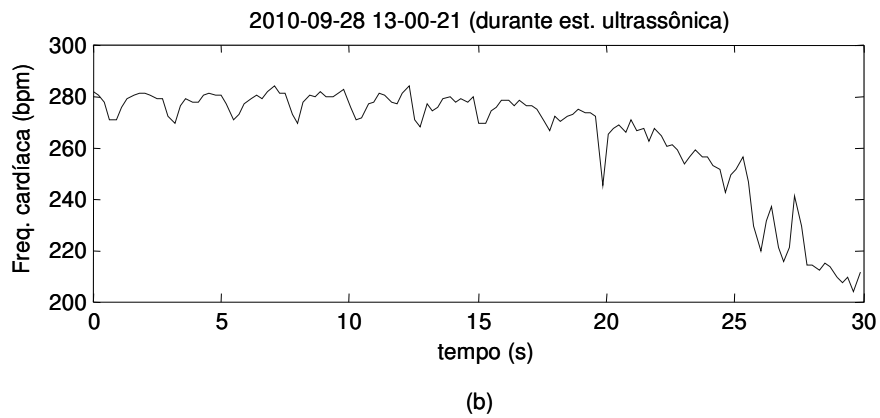
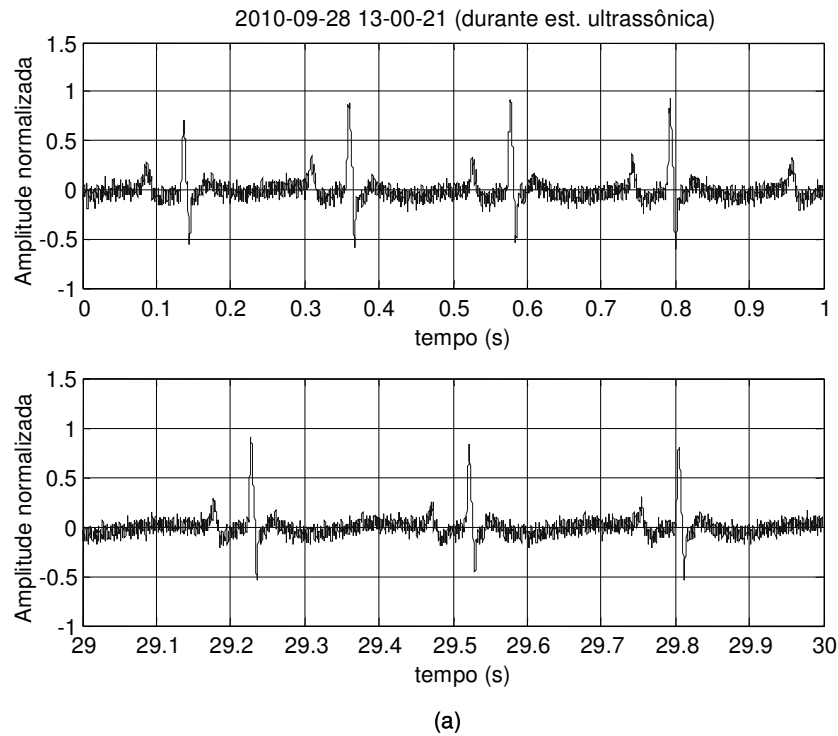


Fig. 7.14 – Monitoramento durante os 30 segundos de estimulação ultrassônica. (a) ECG do primeiro e último segundo; (b) queda na frequência cardíaca durante a exposição.

Os valores obtidos logo após a estimulação ultrassônica, assim como os obtidos 15 minutos após o tratamento, foram normalizados por aqueles obtidos antes da exposição. Esses números são apresentados na Tabela VII.8.

Tabela VII.8 – Variáveis fisiológicas normalizadas expressas como média e erro padrão (EP) para os grupos experimental (n=10) e controle (n=5).

PARÂMETRO	Experimental				Controle			
	Logo após		15 min após		Logo após		15 min após	
	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP	MÉDIA	EP
Frequência respiratória	0,85	0,04	0,75	0,04	0,93	0,02	0,82	0,04
Volume diastólico final	1,11	0,05	1,14	0,05	0,98	0,02	0,88	0,03
Volume sistólico final	1,52	0,21	1,45	0,18	0,98	0,04	0,88	0,06
Volume ejetado	1,06	0,04	1,10	0,05	0,98	0,02	0,88	0,03
Fração de ejeção	0,96	0,02	0,97	0,01	1,00	0,01	1,00	0,01
Frequência cardíaca	0,80	0,02	0,75	0,02	0,99	0,01	0,95	0,02
Débito cardíaco	0,85	0,04	0,83	0,04	0,97	0,01	0,84	0,03
Temperatura	0,97	0,01	0,94	0,01	0,97	0,00	0,96	0,01

A análise de variância bifatorial foi realizada para investigar se diferentes variáveis fisiológicas foram alteradas em resposta à estimulação ultrassônica, e se tais alterações foram duradouras. Os fatores considerados na análise foram o grupo (experimental e controle) e ponto no tempo (logo após e 15 minutos após estimulação ultrassônica). As variáveis fisiológicas investigadas foram: frequência respiratória, volume diastólico final, volume sistólico final, volume ejetado, fração de ejeção, frequência cardíaca, débito cardíaco e temperatura. Os valores analisados foram previamente normalizados pelos valores iniciais (i.e., antes da aplicação do tratamento). O nível de significância estatística foi estabelecido como 0,05. Foi aplicado o teste post-hoc de Bonferroni para comparação das médias. Nos gráficos que apresentam os resultados desse teste, demonstra-se que há diferença significativa quando não há sobreposição dos intervalos de confiança (barras horizontais).

A análise de variância detectou variação na frequência respiratória com o tempo ($p=0,03$), como mostra a Tabela VII. 9. No entanto, tal alteração não foi diferente entre grupos, já que a interação não foi significativa ($p=0,94$). Na realidade, a queda na frequência respiratória ocorreu tanto para o grupo experimental quanto para o grupo controle (ver Tabela VII.8), o que muito provavelmente resultou da inalação do gás

anestésico isoflurano, e não da aplicação de ultrassom. O teste de Bonferroni apresentado na Fig. 7.15 mostra sobreposição dos intervalos de confiança.

Tabela VII.9 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre a frequência respiratória *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média dos Quadrados (SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,04035	1	0,04035	2,79	0,11
Tempo (T)	0,07661	1	0,07661	5,3	0,03
Interação (GxT)	0,00009	1	0,00009	0,01	0,94
Erro	0,37617	26	0,01447		
Total	0,50088	29			

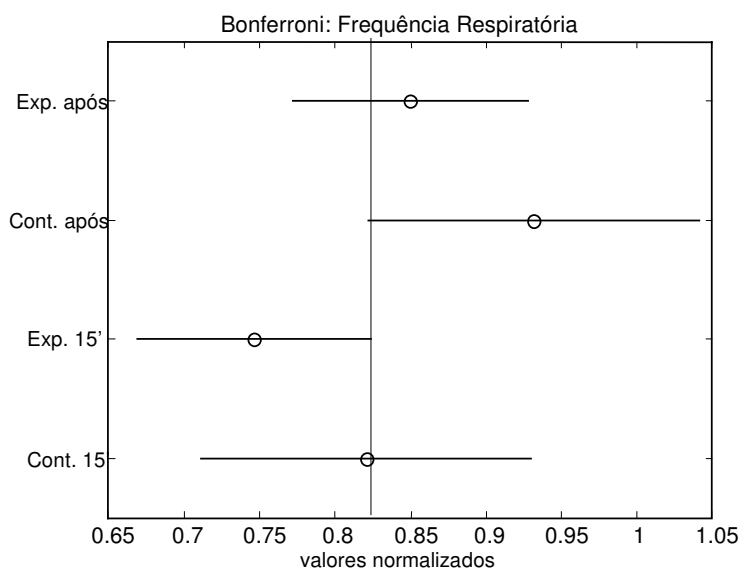


Fig. 7.15 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para frequência respiratória. Círculos correspondem a médias e barras horizontais correspondem a intervalos de confiança (95%).

As Tabelas VII.10, VII.11 e VII.12 apresentam a análise de variância para o efeito do ultrassom sobre os volumes diastólico e sistólico finais, e sobre o volume ejetado, respectivamente. Nos três casos, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos, com uma tendência de aumento dessas variáveis no grupo experimental, e

uma tendência de queda no grupo controle (ver Tabela VII.8), particularmente 15 minutos após a aplicação, quando o teste de Bonferroni detectou diferença significativa entre grupos quanto ao volume diastólico final e volume ejetado (figs. 7.16 e 7.18), mas não para volume sistólico final (fig. 7.17).

Tabela VII.10 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre o volume diastólico final *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: VOLUME DIASTÓLICO FINAL (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,25843	1	0,25843	13,41	0,001
Tempo (T)	0,01029	1	0,01029	0,53	0,47
Interação (GxT)	0,02147	1	0,02147	1,11	0,30
Erro	0,46249	24	0,01927		
Total	0,74626	27			

Tabela VII.11 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre o volume sistólico final *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: VOLUME SISTÓLICO FINAL (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	2,19534	1	2,19534	8,48	0,008
Tempo (T)	0,09012	1	0,09012	0,35	0,56
Interação (GxT)	0,00328	1	0,00328	0,01	0,91
Erro	6,212	24	0,25883		
Total	8,51975	27			

Tabela VII.12 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre o volume ejetado *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: VOLUME EJETADO (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,14905	1	0,14905	9,43	0,005
Tempo (T)	0,00471	1	0,00471	0,3	0,59
Interação (GxT)	0,03216	1	0,03216	2,03	0,17
Erro	0,3794	24	0,01581		
Total	0,56094	27			

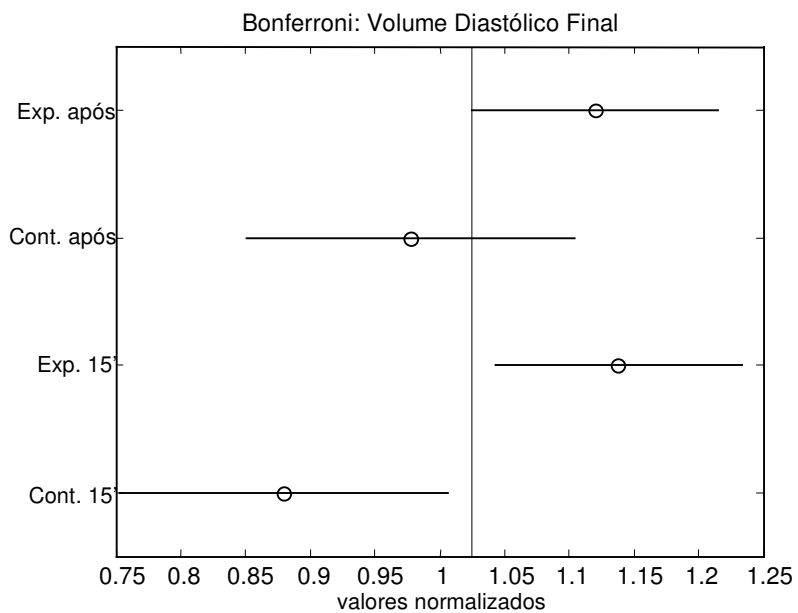


Fig. 7.16 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para volume diastólico final.

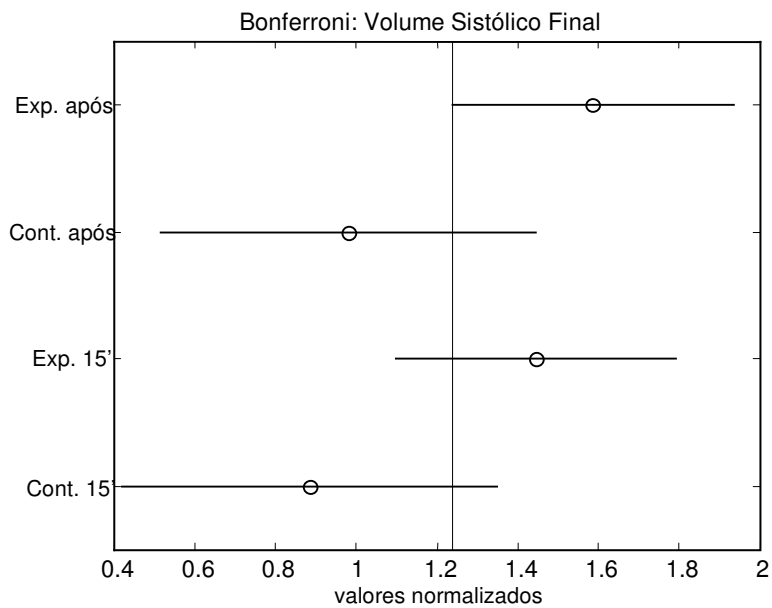


Fig. 7.17 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para volume sistólico final.

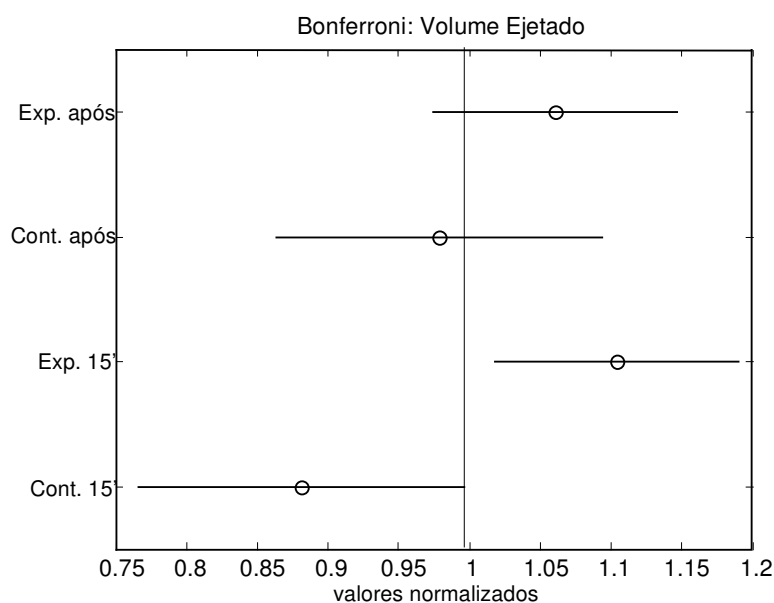


Fig. 7.18 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para volume ejetado.

A fração de ejeção, definida como a razão entre o volume ejetado e o volume diastólico final é um parâmetro clínico usado para se investigar possíveis alterações contráteis no tecido cardíaco. A análise de variância (Tabela VII.13) mostra diferença significativa entre grupos experimental e controle ($p=0,026$) no conjunto dos pontos temporais, sem que o teste de Bonferroni (Fig. 7.19) tenha indicado diferença entre grupos para cada ponto temporal isoladamente. Como a redução relativa da fração de ejeção no grupo experimental foi inferior a 5%, é provável que esta alteração não tenha impacto fisiológico relevante.

Tabela VII.13 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre a fração de ejeção *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: FRAÇÃO DE EJEÇÃO (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,01082	1	0,01082	5,65	0,026
Tempo (T)	0,00097	1	0,00097	0,5	0,48
Interação (GxT)	0,00076	1	0,00076	0,4	0,54
Erro	0,04596	24	0,00192		
Total	0,05919	27			

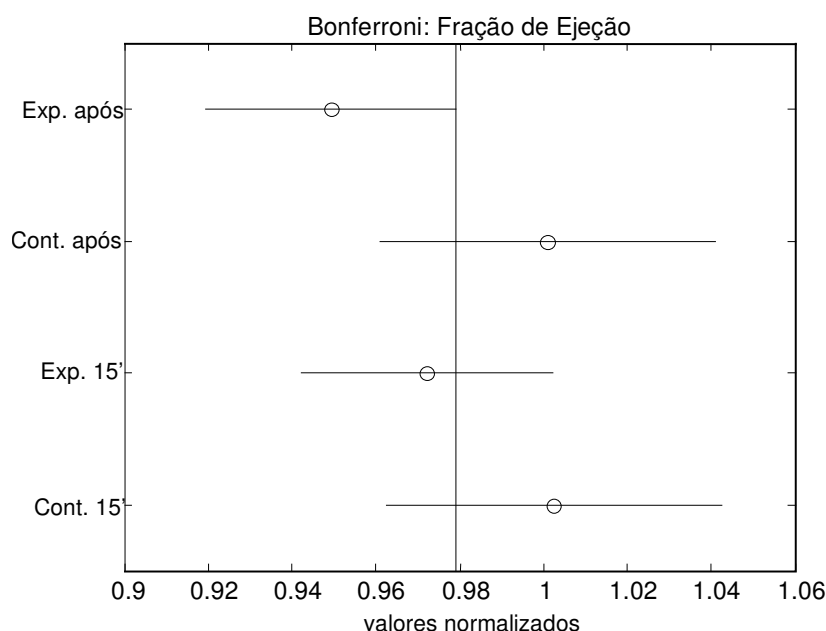


Fig. 7.19 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para fração de ejeção.

A tabela VII.14 expõe os resultados para frequência cardíaca. Houve uma diferença significativa entre grupos ($p < 0,0001$) no conjunto de pontos temporais e entre pontos temporais ($p = 0,046$) no conjunto de grupos. Contudo, o tempo não influenciou cada grupo de forma diferente, já que a interação não foi significativa ($p = 0,81$). A frequência cardíaca caiu com o passar do tempo, tanto para o grupo experimental quanto para o grupo controle (ver Tabela VII.8). O teste de Bonferroni (Fig. 7.20) mostra diferença significativa entre os grupos para cada ponto temporal isoladamente, o que pode ser observado pela ausência de sobreposição das barras horizontais.

Tabela VII.14 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre a frequência cardíaca *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: FREQUÊNCIA CARDÍACA (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,24627	1	0,24627	73,88	0,045 e-7
Tempo (T)	0,01466	1	0,01466	4,4	0,045
Interação (GxT)	0,00019	1	0,00019	0,06	0,81
Erro	0,08667	26	0,00333		
Total	0,35089	29			

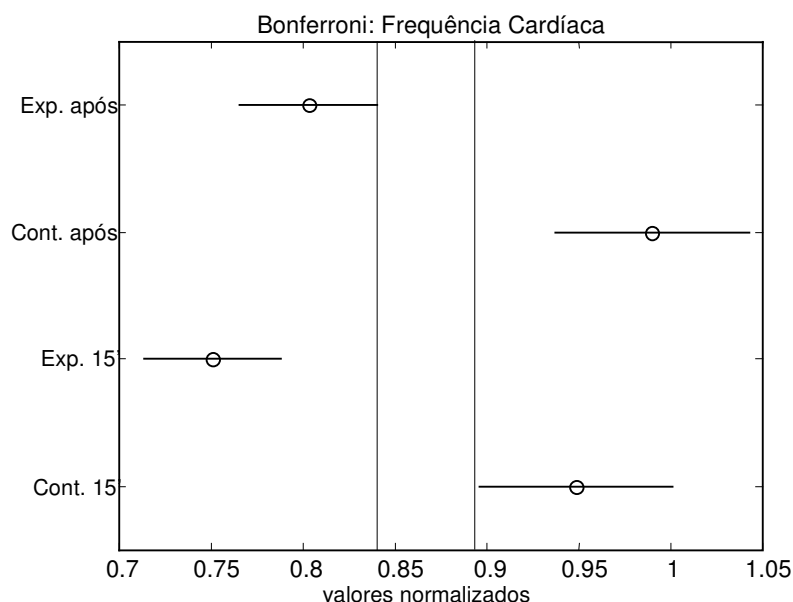


Fig. 7.20 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para frequência cardíaca.

Não houve diferenças significativas entre grupos nem entre pontos temporais no se que refere ao efeito do ultrassom sobre o débito cardíaco, conforme apresentado na Tabela VII.15, embora a Fig.7.21 mostre tendência a débito cardíaco menor que na condição inicial no grupo experimental, nos dois pontos temporais e no grupo controle, após 15 minutos.

Tabela VII.15 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre o débito cardíaco *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: DÉBITO CARDÍACO (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,02022	1	0,02022	1,53	0,28
Tempo (T)	0,03878	1	0,03878	2,94	0,10
Interação (GxT)	0,01968	1	0,01968	1,49	0,23
Erro	0,31663	24	0,01319		
Total	0,38332	27			

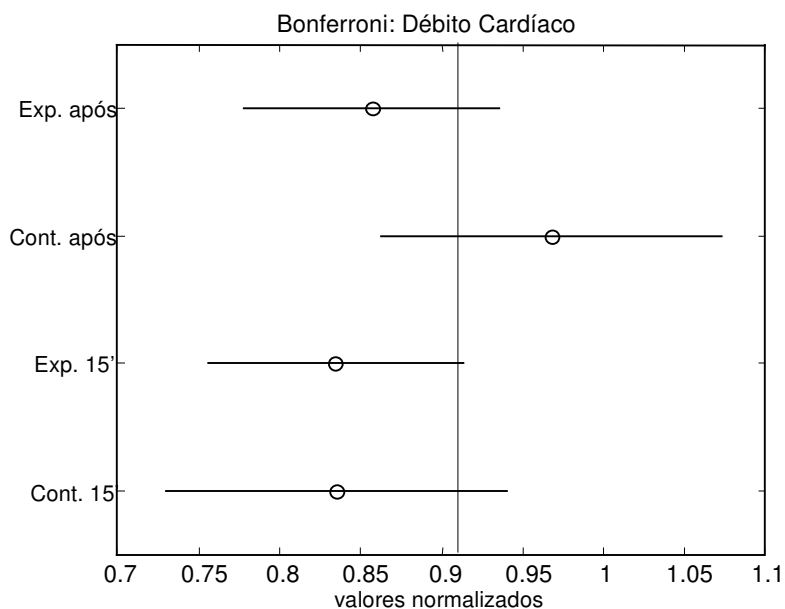


Fig. 7.21 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para débito cardíaco.

A Tabela VII.16 mostra que não houve diferença de temperatura entre grupos. Apesar de ter havido diferença entre pontos temporais, a influência dessa variação não foi diferente para os grupos. A Fig.7.22 mostra sobreposição dos intervalos de confiança para os quatro pares de fatores combinados, de forma que não há diferença significativa detectada pelo teste de Bonferroni.

Tabela VII.16 – Análise de variância bifatorial para o efeito do ultrassom sobre a temperatura *in vivo*.

ANOVA BIFATORIAL: TEMPERATURA (fatores: grupos – experimental e controle; pontos no tempo – 0 e 15 min após)					
	(SQ)	(GL)	(SQ/GL)	F	p
Grupo (G)	0,00091	1	0,00091	1,79	0,19
Tempo (T)	0,00264	1	0,00264	5,18	0,03
Interação (GxT)	0,00008	1	0,00008	0,16	0,69
Erro	0,01325	26	0,00051		
Total	0,01757	29			

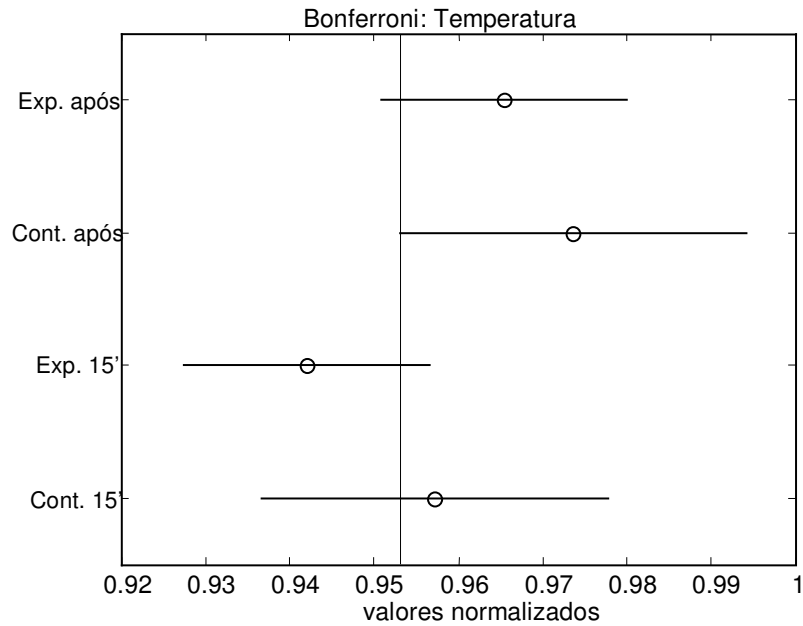


Fig. 7.22 – Teste *post-hoc* de Bonferroni para temperatura.

Ainda que tenham sido observados dois casos de arritmia, foi permitida a recuperação dos ratos, que aparentemente foi boa. Em uma situação (Fig. 7.23), houve despolarizações prematuras ocasionais, detectadas no ECG, mas foram consideradas clinicamente irrelevantes, uma vez que ocorreram após a completa repolarização ventricular (Berne *et al.*, 2003). No segundo caso, a ausência de ondas P provavelmente refletiu um bloqueio sinoatrial, situação em que os átrios não são ativados eletricamente. A recuperação do rato foi mais uma vez permitida, pois a contração atrial não é essencial para o enchimento dos ventrículos em condição de repouso, a não ser que haja estenose valvar (Berne *et al.*, 2003).

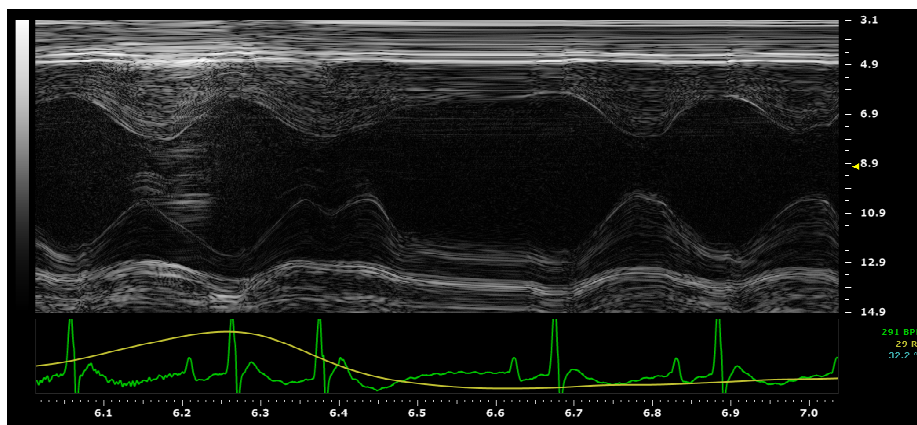


Fig. 7.23 – Despolarização prematura (extra-sístole no ECG) resultando em uma contração ventricular prematura (modo-M).

VII.3. DISCUSSÃO

Apesar dos efeitos adversos, antiarrítmicos vem sendo usados para diminuir a frequência cardíaca durante os episódios de fibrilação atrial (KNOLLMANN & RODEN, 2008) e na prevenção das taquiarritmias ventriculares (MASON, 1993; WALDO *et al.*, 1996; JULIAN *et al.*, 1997). Além disso, desfibriladores implantáveis são comumente prescritos para a prevenção da morte súbita em sobreviventes de fibrilação ventricular ou taquicardia ventricular sustentada (AVID, 1997), embora o choque seja extremamente desconfortável (BRATSFORD, 1992).

A eliminação do cabo-eletrodo é um importante passo para se otimizar as opções de tratamento para arritmias. Uma abordagem é a estimulação elétrica mediada por ultrassom, que foi demonstrada em animais (ECHT *et al.*, 2006) e humanos (LEE *et al.*, 2007). A energia ultrassônica é entregue transtoracicamente a um receptor-eletrodo em contato com o miocárdio, que converte o ultrassom em energia elétrica. Esta é uma aplicação indireta de ultrassom e uma maneira interessante de eliminar os cabos-eletrodos, mas ainda não elimina a estimulação elétrica.

O ultrassom pode ser usado como um meio eficaz e possivelmente indolor de estimular o coração. As ondas ultrassônicas reconhecidamente interferem na atividade

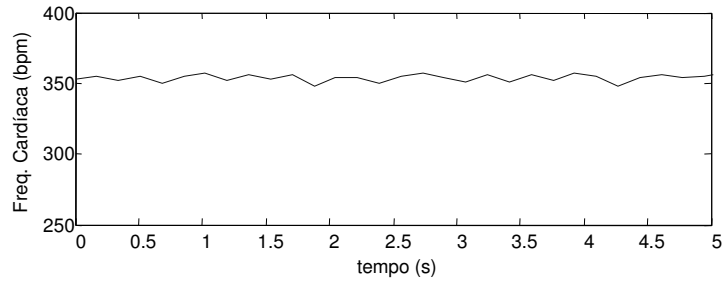
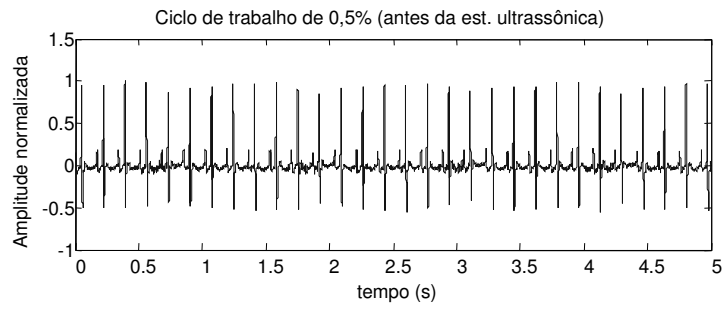
cardíaca de tartaruga (HARVEY, 1929), cão (SMAILY *et al.*, 1981), rã (DALECKI *et al.*, 1997), camundongo (MACROBBIE *et al.*, 1997; ROTA *et al.*, 2006), porco (TOWE & RHO, 2006), e cobaia (KUMA *et al.*, 2006). No entanto, não foi relatado efeito cronotrópico negativo, possivelmente devido ao tipo de exposição ultrassônica, já que foram usadas frequências de repetição do pulso constantes ou ainda excitação contínua. Neste trabalho, o ultrassom com frequência de repetição de pulso variável mostrou capacidade de diretamente diminuir a frequência cardíaca, apresentando, assim, potencial para tratamento de taquiarritmias, de forma exclusiva ou associada à estimulação antitaquicardia. Não se conhece o motivo pelo qual apenas a frequência de repetição de pulso variável resultou em efeitos cronotrópicos negativos. Mais estudos são indicados no sentido de se entender esse efeito.

Sendo o débito cardíaco obtido pelo produto da frequência cardíaca pelo volume ejetado, a redução da frequência cardíaca levaria diretamente a uma diminuição do débito cardíaco. No entanto, há mecanismos que podem compensar a queda da frequência cardíaca. Com menor frequência cardíaca, a duração da diástole mecânica aumenta, o que permite maior enchimento ventricular, aumentando o volume diastólico final, conforme observado nos resultados experimentais. Pelo mecanismo intrínseco de regulação homeométrica (Frank-Starling), o aumento de pré-carga leva a um aumento do volume ejetado, o que resulta em não modificação do débito cardíaco, o que também foi observado.

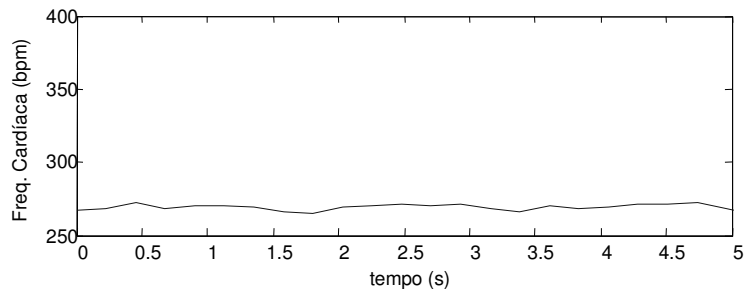
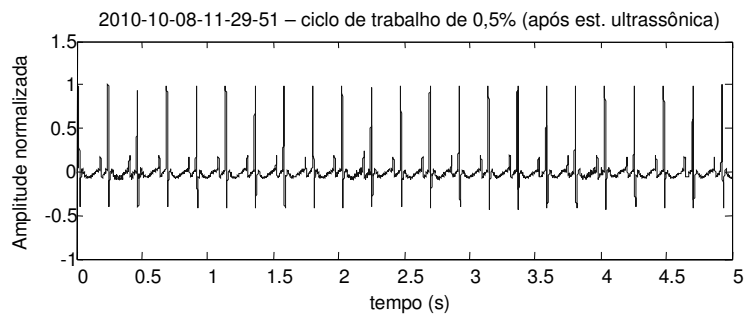
Em 1929, Harvey talvez tenha sido o primeiro a notar que as ondas ultrassônicas produzem um efeito estimulante muito claro sobre o coração isolado em atividade, afirmando que "o músculo cardíaco é, sem dúvida, facilmente estimulado por estas ondas" (HARVEY, 1929). O autor usou um cristal de quartzo para gerar ondas ultrassônicas de 340kHz, que foram usadas para estimular o coração. Observou um aumento imediato na frequência cardíaca, associado a uma diminuição na amplitude de contração. Naquele momento, sua preocupação era a dificuldade de passagem das ondas através da parede torácica. Neste trabalho, demonstrou-se que o ultrassom de 1MHz, administrado por via transtorácica, é capaz de diminuir a frequência cardíaca por meio de uma sequência específica de *bursts*, com frequência de repetição variável e decrescente.

Além da magnitude e da forma de onda do estímulo, a resposta ao estiramento depende da janela temporal com relação ao ciclo cardíaco. Estudos indicam que as janelas de sensibilidade para estimulações acústica e elétrica são similares, isto é, ocorrem durante o segmento T-P (DALECKI *et al.*, 1991). As anormalidades de condução observadas provavelmente ocorreram devido à estimulação ultrassônica durante a fase vulnerável de repolarização cardíaca. Uma vez que a abordagem nesse trabalho envolve a variação na frequência de repetição de pulso, os pulsos ultrassônicos não têm como ser sincronizados com uma janela específica do ECG. Com o intuito de minimizar efeitos adversos, ajustes podem ser feitos ao ciclo de trabalho. Nesse sentido, um experimento mostrou que 0,5%, correspondente à metade da energia aplicada, parece funcionar (Fig 7.24).

Neste trabalho, estimular o coração a uma frequência de repetição de pulso fixa, usando o transdutor de 1MHz, não resultou em efeitos cronotrópicos. Testou-se também o transdutor de 65,7kHz, que não resultou em efeitos cronotrópicos *in vivo*, possivelmente devido à sua geometria, e não devido à sua frequência de ressonância. O único estudo na literatura a relatar o uso do ultrassom como marca-passo cardíaco foi conduzido submetendo-se porcos a bradicardia induzida por hipóxia, e posteriormente restabelecendo-se a frequência cardíaca. Para a ocorrência do efeito cronotrópico positivo, os autores aplicaram ultrassom com frequência de 70kHz, pressão de 3MPa, sendo pulsos de 5ms a uma frequência de repetição de pulso próxima a frequência cardíaca fisiológica (TOWE & RHO, 2005).



(a)



(b)

Fig. 7.24 – Monitoramento da frequência cardíaca (a) antes e (b) após estimulação ultrassônica de 1MHz com frequência de repetição de pulso variável, ciclo de trabalho de 0,5% e pressão de rarefação de 3MPa.

O regime de insonificação utilizado neste estudo exclui efeitos térmicos. Portanto, os efeitos observados resultam de mecanismos não-térmicos, possivelmente uma combinação da vibração, promovida pela propagação da onda ultrassônica no tecido, e do mecanismo de força de radiação. A força de radiação foi associada a alterações cardíacas em rãs (DALECKI *et al.*, 1993a; DALECKI *et al.*, 1997) e porcos (TOWE & RHO, 2006). É um efeito de segunda ordem da propagação da onda, que é capaz de empurrar a matéria. Em tecidos biológicos, estima-se que a força da radiação seja entre 0,1% a 1% da pressão instantânea. Pulsos de ultrassom de alta intensidade produzem maiores efeitos de força de radiação (RUDENKO *et al.*, 1996). Considerando-se que a força de radiação seja 1% de uma onda de 3MPa, seria criada no coração uma pressão transitória de 30kPa (ou 0,3atm ou 225mmHg). Além da força de radiação acústica, a frequência de repetição de pulso variável (estímulo ultrassônico variável) contribuiu decisivamente para a observação do efeito.

O efeito observado pode estar relacionado a canais mecanossensíveis, capazes de alterar a probabilidade de abertura em resposta a um estímulo mecânico (GU *et al.*, 2001), que podem ser divididos didaticamente em canais ativados por estiramento (SAC) e canais ativados por volume (VAC). Estes podem ser subdivididos por sua seletividade iônica, como, por exemplo, canais de cátions não-seletivos (SAC_{NS}), canais de potássio seletivos (SAC_K), ou canais de cloreto seletivos (VAC_{Cl}) (KOHL *et al.*, 2006). No passado, o aumento de volume do miócito foi associado ao aumento da taxa espontânea de atividade pela ativação de VAC_{Cl}. No entanto, experimentos demonstraram que o contrário ocorre: células do nó sino-atrial com atividade espontânea reduzem sua frequência em cerca de 24% durante o aumento de volume (Kohl & Sachs, 2001; Lei & Kohl, 1998). Apesar do nome, VAC_{Cl} não é apenas estimulado pelos aumentos osmótico e hidrostático no volume celular, mas também por estiramento mecânico direto. VAC_{Cl} é amplamente distribuído em todo o coração e desempenha papel na arritmogênese, lesões do miocárdio, pré-condicionamento, e apoptose dos miócitos (BAUMGARTEN & CLEMO, 2003).

É possível que mecanorreceptores estejam envolvidos na diminuição reflexa da frequência cardíaca (via aumento do tônus vagal). Uma possibilidade é o reflexo de Bezold-Jarisch, um reflexo cardio-inibitório que resulta em bradicardia, vasodilatação e hipotensão.

Origina-se em receptores cardíacos, localizados principalmente na parede póstero-inferior do ventrículo esquerdo, que são influenciados por estímulo mecânico ou químico, levando ao aumento da atividade parassimpática e à inibição da atividade simpática (MARK, 1983). Como o reflexo de Bezold-Jarisch pode ser abolido pela secção dos nervos vagos ou minimizado pelo uso de atropina (antagonista colinérgico muscarínico), essas são formas de se verificar se há envolvimento de tal reflexo.

Como a literatura mostra que a redução da frequência cardíaca por meio da estimulação parassimpática protege o coração contra o desenvolvimento de alguns tipos de arritmias potencialmente nocivas (SCHWARTZ *et al.*, 1984), a sequência de ultrassom aqui proposta também deve ser protetora. Sabe-se, no entanto, que uma vez que a estimulação vagal é interrompida, seus efeitos decaem muito rapidamente (BERNE *et al.*, 2003), o que não ocorreu nos presentes experimentos. Na realidade, o efeito cronotrópico negativo observado persiste por 15 minutos ou mais após a interrupção do estímulo ultrassônico. Ressalta-se que esse efeito não parece resultar do uso do anestésico isoflurano, uma vez que este não costuma causar bradicardia (EGER, 1984; DALE & BROWN, 1987). Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos neste efeito cronotrópico negativo.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÃO

Foram modelados, construídos e caracterizados seis transdutores ultrassônicos, com diferentes geometrias e frequências de ressonância (1MHz, 50,7kHz, 65,7kHz, 54,8kHz, 44,2kHz e 102kHz). Os transdutores T1 (1MHz), T3 (65,7kHz) e T6 (102kHz) se mostraram mais interessantes para a aplicação pretendida. Além desses transdutores, foi testado também um transdutor de fisioterapia (1MHz) desenvolvido pelo grupo do Laboratório de Ultrassom do PMR/USP.

Em estudos realizados em coração isolado de ratos Wistar, houve redução da força relacionada ao aumento da duração de aplicação contínua prolongada de ultrassom de 1MHz (TA). Para os outros parâmetros estudados, o ultrassom não interferiu na atividade cardíaca, apesar de terem sido observados efeitos pró-arrítmicos isolados pelo uso do ultrassom de alta potência com frequência de 65,7kHz em excitação contínua.

Nos estudos *in vivo*, o transdutor de 65,7kHz produziu lesões na pele e musculatura esquelética subjacente antes de provocar qualquer efeito no coração. Provavelmente, o ocorrido resultou da geometria, e não da frequência de ressonância do transdutor. Já o transdutor de 1MHz, quando excitado por uma determinada sequência experimental, foi capaz de diminuir a frequência cardíaca em 19%. Uma vez removido o estímulo ultrassônico, o efeito cronotrópico negativo durou até ao final de cada experimento (15 a 45 minutos).

Este estudo é o primeiro a demonstrar que o ultrassom transtorácico tem potencial para reduzir a frequência cardíaca de forma não invasiva *in vivo*. Assim, o ultrassom é uma técnica promissora para o tratamento de taquiarritmias, sendo uma alternativa às tecnologias invasivas existentes. A chave para o fenômeno observado parece

ser a variação da frequência de repetição do pulso, uma vez que nenhum efeito foi observado em experimentos preliminares usando taxas de repetição constantes.

VIII.1. TRABALHOS FUTUROS

Uma vez expostas as principais conclusões, propõem-se os seguintes temas para prosseguimento da pesquisa:

1. Com o intuito de se esclarecer se o aumento do tônus vagal está envolvido na resposta cronotrópica negativa, pode-se incluir a secção vagal em experimentos semelhantes. Caso a secção vagal deprima acentuadamente a resposta, demonstra-se ser essa a principal via nervosa responsável pelo reflexo. Paralelamente, deve-se monitorar a pressão arterial, de forma a se detectar a ocorrência de hipotensão e, assim, se elucidar a possibilidade de envolvimento do reflexo de Bezold-Jarisch.
2. De modo a minimizar possíveis efeitos adversos da aplicação terapêutica do ultrassom proposta neste trabalho, pode-se tentar reduzir ainda mais o ciclo de trabalho. Não se pode, no entanto, sincronizar os pulsos de ultrassom com uma determinada fase do ciclo cardíaco, uma vez que a abordagem aqui descrita envolve a variação da frequência de repetição de pulso do ultrassom.
3. Fabricar outros transdutores ultrassônicos de diferentes frequências de ressonância, mas com aberturas semelhantes, capazes de irradiar o coração inteiro. Testar os transdutores em animais, aplicando-se a sequência ultrassônica proposta neste trabalho, buscando-se investigar a influência da frequência de ressonância do ultrassom na resposta fisiológica dos animais.
4. Buscar outras sequências de aplicação o ultrassom capazes de exercer efeito cronotrópico positivo ou ainda efeito inotrópico positivo.

VIII.2. PUBLICAÇÕES

A presente tese resultou em 3 publicações em congressos nacionais, 2 publicações em congressos internacionais e 1 submissão para publicação em revista internacional. São elas:

1. BELASSIANO, E., BUIOCHI, F., ANDRADE, M. A. B., ADAMOWSKI, J. C., COSTA, E. T., 2006, “Protótipo de um Transdutor Ultra-Sônico Matricial Linear para Imagens Médicas”, *XX CBEB - Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, São Pedro, SP, CD-ROM (ISBN 85-98739-02-2), p. 866-869.
2. BELASSIANO, E., BUIOCHI, F., COSTA, E. T., 2008 “Construção e caracterização de um transdutor ultra-sônico de potência com frequência de 50 kHz”, *XXI CBEB - Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, Salvador, BA, CD-ROM (ISBN 978-85-60064-13-7).
3. BELASSIANO, E., BASSANI, R. A., COSTA, E. T., 2010, “Estudo da interação entre o ultrassom com frequência de 1MHz e o tecido cardíaco”, *XXII CBEB - Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, Tiradentes, MG, CD-ROM (ISSN 2179-3220), p. 124-127.
4. BELASSIANO, E., BUIOCHI, F., BASSANI, R. A., COSTA, E. T., 2011, “Modeling, construction and characterization of a 66-kHz ultrasound transducer for cardiac experimentation”, *Eighth IASTED Conference on Biomedical Engineering*, Innsbruck, Áustria, CD-ROM (ISBN 978-0-88986-866-3), p. 407-412.
5. BELASSIANO, E., MILLER, R. J., HARTMAN, E., O'BRIEN JR., W. D., BUIOCHI, F., COSTA, E. T., 2011, “The role of ultrasound operation mode for safely interfering in the heart rate”, *Pan American Health Care Exchanges -*

PAHCE, Rio de Janeiro, RJ, CD-ROM and print (ISBN 978-1-61284-917-1 and 978-1-61284-916-4), p. 254-259.

7. BELASSIANO, E., MILLER, R. J., HARTMAN, E., BUIOCHI, F., BASSANI, R. A., COSTA, E. T., O'BRIEN JR., W. D., 2011, "Cardiac ultrasonic stimulation as an alternative for treating tachyarrhythmia". *Submetido ao Ultrasound in Medicine and Biology*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSYS, 2007. Release 11.0. ANSYS Tutorials. ANSYS, Inc.

ANDERSON, K. P., 2002, “Sudden cardiac death unresponsive to implantable defibrillator therapy: an urgent target for clinicians, industry and government”, *J Interv Card Electrophysiol*, v. 14, pp. 71-8.

ARNOLD, F. J., MUHLEN, S. S., 2001, “The resonance frequencies on mechanically pre-stressed ultrasonic piezotransducers”, *Ultrasonics*, v. 39, pp. 1-5.

AVID - The Antiarrhythmics Versus Implantable Defibrillators - Investigators, 1997, “A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias”, *N Engl J Med*, v. 337, pp. 1576-83.

BARDY, G. H., SMITH, W. M., HOOD, M. A., CROZIER, I. G., MELTON, I. C., JORDAENS, L., THEUNS, D., PARK, R. E., WRIGHT, D. J., CONNELLY, D. T., FYNN, S. P., MURGATROYD, F. D., SPERZEL, J., NEUZNER, J., SPITZER, S. G., ARDASHEV, A. V., ODURO, A., BOERSMA, L., MAASS, A. H., VAN GELDER, I. C., WILDE, A. A., VAN DESSEL, P. F., KNOPS, R. E., BARR, C. S., LUPO, P., CAPPATO, R., GRACE, A. A., 2010, “An entirely subcutaneous implantable cardioverter-defibrillator”, *N Engl J Med*, v. 363, pp. 36-44.

BAUMGARTEN, C. M., CLEMO, H. F., 2003, “Swelling-activated chloride channels in cardiac physiology and pathophysiology”, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, v. 82, pp. 25-42.

BIGDELI, A. K., BEIRAS-FERNANDEZ, A., KACZMAREK, I., KOWALSKI, C., SCHMOECKEL, M., REICHAERT, B., 2010, “Successful management of late right ventricular perforation after pacemaker implantation”, *Vasc Health Risk Manag*, v. 6, pp. 27-30.

BÖHM, A., PINTÉR, A., DURAY, G., LEHOCZKY, D., DUDAS, G., TOMCSÁNYI, I., PRÉDA, I., 2001, “Complications due to abandoned noninfected pacemaker leads”, *Pacing Clin Electrophysiol*, v. 24, pp. 1721-1724.

BRATSFORD, W., 1992, Pacemakers and antitachycardia devices, In Zaret B. L., Moser M. & Cohen L. S., Yale University School of Medicine Heart Book (1st ed). New York: William Morrow & Co, 432p.

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

- BAKER, K. G., ROBERTSON, V. J., DUCK, F. A., 2001, "A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects", *Phys Ther*, v. 81, n. 7, pp. 1351-1358.
- BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M., STANTON, B. A., 2003, *Physiology*, Saint Louis: Mosby, 5th ed, 1024p.
- BORGES, A. C., WALDE, T., REIBIS, R. K., GROHMANN, A., ZIEBIG, R., RUTSCH, W., SCHIMKE, I., BAUMANN, G., 2002, "Does contrast echocardiography with Optison induce myocardial necrosis in humans?", *J Am Soc Echocardiogr*, v. 15, n. 10, pp. 1080 – 1086.
- CANNON, L. A., JOHN, J., LALONDE, J., 2001, "Therapeutic ultrasound for chronic total coronary artery occlusions", *Echocardiogr*, v. 18, n. 3, pp. 219-223.
- DALE, O., BROWN Jr, B.R., 1987, "Clinical pharmacokinetics of the inhalational anaesthetics", *Clin Pharmacokinet.*, v. 12, n. 3, pp. 145-67.
- DALECKI, D., KELLER, B. B., RAEMAN, C. H., CARSTENSEN, E. L., NEEL, D. S., PALLADINO, J. L., NOORDERGRAAF, A., 1991, "Thresholds for premature ventricular contractions in frog hearts exposed to lithotripter fields", *Ultrasound Med Biol*, v. 17, pp. 341-346.
- DALECKI, D., KELLER, B. B., RAEMAN, C. H., CARSTENSEN, E. L., 1993a, "Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: I. Thresholds for changes in cardiac rhythm and aortic pressure" *Ultrasound Med Biol*, v. 19, pp. 385-390.
- DALECKI, D., RAEMAN, C. H., CARSTENSEN, E. L., 1993b, "Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: II. An investigation of heating as a potential mechanism", *Ultrasound Med Biol*, v. 19, n. 5, pp. 391 – 398.
- DALECKI, D., RAEMAN, C. H., CHILD, S. Z., CARSTENSEN, E. L., 1997, "Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: III. The radiation force mechanism", *Ultrasound Med Biol*, v. 23, n. 2, pp. 275 – 285.
- DALECKI, D., 2004, "Mechanical bioeffects of ultrasound", *Annu Rev of Biomed Eng*, v. 6, pp. 229-248.
- DALECKI, D., ROTA, C., RAEMAN, C. H., CHILD, S. Z., 2005, "Premature cardiac contractions produced by ultrasound and microbubble contrast agents in mice", *Acoust Res Lett Onl*, v. 6, n. 3, pp. 221 – 226.
- DALECKI, D., 2007, "WFUMB Safety Symposium on Echo Contrast Agents: Bioeffects of ultrasound contrast agents *in vivo*", *Ultrasound Med Biol*, v. 33, n. 2, pp. 205 – 2213.

- DELIUS, M., HOFFMAN, G., STEINBECK, G., CONZEN, P., 1994, "Biological effects of shock waves: induction of arrhythmia in piglet hearts", *Ultrasound Med Biol*, v. 20, pp. 279-285.
- DENG, C. X., QU, F., NIKOLSKI, V. P., ZHOU, Y., EFIMOV, I. R., 2005, "Fluorescence imaging for real-time monitoring of high-intensity focused ultrasound cardiac ablation", *Ann Biomed Eng*, v. 33, n. 10, pp. 1352-1359.
- DINNO, M. A., DYSON, M., YOUNG, S. R., MORTIMER, A. J., HART, J., CRUM, L. A., 1989, "The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound", *Phys Med Biol*, v. 34, pp. 1543-1552.
- DUBUS, B. S., DEBUS, J. C., DECARPIGNY, J. N., BOUCHER, D., 1991, "Analysis of mechanical limitations of high power piezoelectric transducers using finite element modeling", *Ultrasonics*, v. 29, pp. 201-207.
- DUBUS, B., HAW, G., GRANGER, C., LEDEZ, O., 2002, "Characterization of multilayered piezoelectric ceramic for high power transducers", *Ultrasonics*, v. 40, pp. 903-906.
- DUCK, F. A., 2002, "Nonlinear Acoustics in Diagnostic Ultrasound", *Ultrasound Med Biol*, v. 28, n. 1, pp. 1-18.
- DURAY, G. Z., SCHMITT, J., CICEK-HARTVIG, S., HOHNLOSER, S. H., ISRAEL, C. W., 2009, "Complications leading to surgical revision in implantable cardioverter defibrillator patients: comparison of patients with single-chamber, dual-chamber, and biventricular devices", *Europace*, v. 11, pp. 297-302.
- ECHT, D. S., COWAN, M. W., RILEY, R. E., BRISKEN, A. F., 2006, "Feasibility and safety of a novel technology for pacing without leads", *Heart Rhythm*, v. 3, pp. 1202-1206.
- EGER 2nd, E. I., 1984, "The pharmacology of isoflurane", *Br J Anaesth.*, v. 56, n. 1, pp. 71S-99S.
- EICH, C., BLECKMANN, A., PAUL, T., 2005, "Percussion pacing in a three-year-old girl with complete heart block during cardiac catheterization", *Br J Anaesth*, v. 95, n. 4, pp. 429-433.
- EICH, C., BLECKMANN, A., SCHWARZ, S. K. W., 2007, "Percussion pacing—an almost forgotten procedure for haemodynamically unstable bradycardias? A report of three case studies and review of the literature", *Br J Anaesth*, v. 98, n. 4, pp. 465-7.
- EISENBERG, M. S., MENGERT, T. J., 2001, "Cardiac Resuscitation", *N Engl J Med*, v. 344, n. 17, pp. 1304-1313.

- ELLENBOGEN, K. A., WOOD, M. A., SHEPARD, R. K., 2002, “Delayed complications following pacemaker implantation”, *Pacing Clin Electrophysiol*, v. 25, pp. 1155–1158.
- FDA, 1997, *Information for Manufacturers Seeking Marketing Clearance of Diagnostic Ultrasound Systems and Transducers*. US Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- FISH, P., 1994, *Physics and Instruments of Diagnostic Medical Ultrasound*. 3 ed., Chichester, John Wiley & Sons.
- FORESTER, G. V., MORTIMER, A. J., ROY, O. Z., BATESON, D., KEON, W. J., 1984, “Effect of brief ultrasound exposure on post-tetanic potentiation in cardiac muscle”, *Pflug Arch Eur J Phy*, v. 400, pp. 208-210.
- FORESTER, G. V., ROY, O. Z., MORTIMER, A. J., 1982, “Enhancement of contractility in rat isolated papillary muscle with therapeutic ultrasound”, *J Mol Cell Cardiol*, v. 14, pp. 475-477.
- FORESTER, G. V., ROY, O. Z., MORTIMER, A. J., 1985, “Ultrasound intensity and contractile characteristics of rat isolated papillary muscle”, *Ultrasound Med Biol*, v. 11, n. 4, pp. 591-598.
- GALLEGO-JUÁREZ, J. A., 1989, “Piezoelectric ceramics and ultrasonic transducers”, *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, v. 22, pp. 804-816.
- GRAHAM-ROWE, D., 2005, “Hotwire my heart”, *Nature*, v. 435, pp. 14-15.
- GREENBERG, S., FINKELSTEIN, A., RAISMAN, E., SHAPIRA, I., KORONOWSKI, R., LANIADO, S., KEREN, G., 2000, “Direct ultrasound application had no effect on cardiac hemodynamic performance in a baseline isolated rat heart model”, *Ultrasound Med Biol*, v. 26, n. 2, pp. 315-319.
- GU, C. X., JURANKA, P. F., MORRIS, C. E., 2001, “Stretch-activation and stretch-inactivation of shaker-IR, a voltage-gated K1 channel”, *Biophysical Journal*, v. 80, pp. 2678–2693.
- HARVEY, E. N., 1929, “The effect of high frequency sound waves on heart muscle and other irritable tissues”, *Am. J. Physiol*, v. 91, pp. 284–290.
- HASSON, S., MUNDORF, R., BARNES, J., WILLIAMS, J., FUJI, M., 1990, “Effect of pulsed ultrasound versus placebo on muscle soreness perception and muscular performance”, *Scand J Rehab Med*, v. 22, pp. 199 – 205.
- HEIKKOLA, E., LAITINEN, M., 2005, “Model-based optimization of ultrasonic transducers”, *Ultrason Sonochem*, v. 12, pp. 53-57.

- HEKKENBERG, R. T., BEISSNER, K., ZEQUIRI, B., 2000, "Therapy-level ultrasonic power measurement". *Final technical report SMT4-CT96-2139. European Commission.*
- HUMPHREY, V. F., 2003, "Non-Linear Propagation For Medical Imaging", *Proceeding of the World Congress on Ultrasonics 2003*, pp. 73-80.
- HUMPHREY, V. F., 2007, "Ultrasound and matter – Physical interactions", *Prog Biophys Mol Biol*, v. 93, pp. 195 – 211.
- IEC 61689 International Standard, 2007-08. "Ultrasonics – Physiotherapy systems – Field specifications and methods of measurements in the frequency range of 0,5 MHz a 5 MHz", edition 2.0.
- IULA, A., VAZQUEZ, F., PAPPALARDO, M., GALLEGO, J. A., 2002, "Finite element three-dimensional analysis of the vibrational behaviour of the Langevin-type transducer", *Ultrasonics*, v. 40, pp. 513-517.
- IULA, A., PARENTI, L., FABRIZI, F., PAPPALARDO, M., 2006, "A high displacement ultrasonic actuator based on a flexural mechanical amplifier", *Sens Actuat A*, v. 125, pp. 118-123.
- JULIAN, D. G., CAMM, A. J., FRANGIN, G., JANSE, M. J., MUNOZ, A., SCHWARTZ, P. J. & SIMON, P., 1997, "Randomized trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators", *Lancet*, v. 349, pp. 667-674.
- KINSLER, L. E., FREY, A. R., COPPENS, A. B., SANDERS, J. V., 1982, *Fundamentals of Acoustics*, 3ed. New York, John Wiley and Sons.
- KLEEMAN, T., BECKER, T., DOENGES, K., VATER, M., SENGEN, J., SCHNEIDER, S., SAGGAU, W., WEISSE, U., SEIDL, K., 2007, "Annual rate of transvenous defibrillation lead defects in implantable cardioverter- defibrillators over a period of >10 years", *Circulation*, v. 115, pp. 2474-2480.
- KNOLLMANN, B. C., RODEN, D. M., 2008, "A genetic framework for improving arrhythmia therapy", *Nature*, v. 451, pp. 929-936.
- KOHL, P., BOLLENSDORFF, C., GARNY, A., 2006, "Effects of mechanosensitive ion channels on ventricular electrophysiology: experimental and theoretical models", *Exp Physiol*, v. 91, n. 2, pp. 307–321.
- KOHL, P., HUNTER, P., NOBLE, D., 1999, "Stretch-induced changes in heart rate and rhythm: clinical observations, experiments and mathematical models", *Prog Biophys Mol Biol*, v. 71, pp. 91–138.

- KOHL, P., SACHS, F., 2001, “Mechano-electric feedback in cardiac cells”, *Phil Trans. R. Soc. London A*, v. 359, pp. 1173–1185.
- KUMA, F., UEDA, N., ITO, H., MARUYAMA, T., KAJI, Y., FUJINO, T., HARADA, M., 2006, “Effects of ultrasound energy application on cardiac performance in open-chest guinea pigs”, *Circulation Journal*, v. 70, n. 10, pp. 1356-1361.
- KUTALEK, S. P., 2004, “Pacemaker and defibrillator lead extraction”, *Curr Opin Cardiol*, v. 19, pp. 19-22.
- LEE, K. L., 2010, “In the wireless era: leadless pacing”, *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, v. 8, n. 2, pp. 171-174.
- LEE, K. L., LAU, C. P., TSE, H. F., ECHT, D. S., HEAVEN, D., SMITH, W., HOOD, M., 2007, “First human demonstration of cardiac stimulation with transcutaneous ultrasound energy delivery: implications for wireless pacing with implantable devices”, *J Am Coll Cardiol*, v. 50, pp. 877– 883.
- LEI, M., KOHL, P., 1998, “Swelling-induced decrease in spontaneous pacemaker activity of rabbit isolated sino-atrial node cells”, *Acta Physiol Scand*, v. 164, pp. 1-12.
- LEIGHTON, T. G., 1997, *The Acoustic Bubble*, 2.ed., San Diego / London, Academic Press.
- LEIGHTON, T. G., 2007, “What is ultrasound?”, *Prog Biophys Mol Biol*, v. 93, pp. 3-83.
- LI, P., CAO, L., DOU, C., ARMSTRONG, W. F., MILLER, D., 2003, “Impact of myocardial contrast echocardiography on vascular permeability: an *in vitro* dose response study of delivery mode, pressure amplitude and contrast dose.” *Ultrasound Med Biol*, v. 9, pp. 1341-1349.
- MACROBBIE, A. G., RAEMAN, C. H., CHILD, S. Z., DALECKI, D., 1997, “Thresholds for premature contractions in murine hearts exposed to pulsed ultrasound”, *Ultrasound Med Biol*, v. 23, n. 5, pp. 761 – 765.
- MAISEL, W. H., 2008, “Semper fidelis — consumer protection for patients with implanted medical devices”, *N Engl J Med*, v. 358, pp. 985-987.
- MARBAN, E., 2002, “Cardiac channelopathies”, *Nature*, v. 415, pp. 213-218.
- MARK, A. L., 1983, “The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart”, *J Am Coll Cardiol*, v. 1, pp. 90-102.
- MARON, B. J., ESTES, N. A. M. 3rd, 2010, “Commotio Cordis”, *N Engl J Med*, v. 362, pp. 917-927.

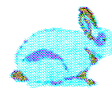
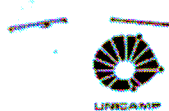
- MASON, J. W., 1993, “A comparison of seven antiarrhythmic drugs in patients with ventricular tachyarrhythmias”, *N Engl J Med*, v. 329, pp. 452-458.
- MATLAB Central. Disponível em www.mathworks.com/matlabcentral [14/09/2009].
- MILLER, D. L., QUADDUS, J., 2000, “Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice”, *P Natl Acad Sci*, v. 97, pp. 10179-10184.
- MORTIMER, A. J., BRESDEN, B., FORESTER, G. V., ROY, O. Z., 1984, “System for the measurement of the effects of ultrasound on membrane electrical and mechanical properties of the myocardium”, *Med Biol Eng Comput*, v. 22, pp. 24-27.
- MORTIMER, A. J., DYSON, M., 1988, “The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts”, *Ultrasound Med Biol*, v. 14, pp. 499 – 506.
- MORTIMER, A. J., ROY, O. Z., TROLLOPE, B. J., MCEWEN, J. I., TAICHMAN, G. C., FORESTER, G. V., KEON, W. J., 1980, “A relationship between ultrasonic intensity and changes in myocardial mechanics”, *Can J Physiol Pharm*, v. 58, pp. 67-73.
- NATTEL, S., 1998, “Experimental evidence for proarrhythmic mechanisms of antiarrhythmic drugs”, *Cardiovasc. Res.*, v. 37, pp. 567–577.
- NATTEL, S., 2002, “New ideas about atrial fibrillation 50 years on”, *Nature*, v. 415, pp. 219–226.
- NERHEIM, P., BIRGER-BOTKIN, S., PIRACHA, L., OLSHANSKY, B., 2004, “Heart failure and sudden death in patients with tachycardia-induced cardiomyopathy and recurrent tachycardia”, *Circulation*, v. 110, pp. 247–252.
- NESBITT, A. D., COOPER, P. J., KOHL, P., 2001, “Re-discovering commotio cordis”, *The Lancet*, v. 357, pp. 1195–1197.
- O’BRIEN JR., W. D., 2007, “Ultrasound – Biophysics mechanisms”, *Prog Biophys Mol Biol*, v. 93, pp. 212 – 255.
- OLIVEIRA, P. X., BASSANI, R. A., BASSANI, J. W. M., 2008, “Lethal effects of electrical fields on isolated ventricular myocytes”, *IEEE T Biomed Eng*, v. 55, pp. 2635-2642.
- PELLIS, T., KETTE, F., LOVISA, D., FRANCESCHINO, E., MAGAGNIN, L., MERCANTE, W. P., KOHL, P. 2009, “Utility of pre-cordial thump for treatment of out of hospital cardiac arrest: A prospective study”, *Resuscitation*, v. 80, n. 1, pp. 17-23.

- PETRISHCHEV, N. N., VLASOV, T. D., GALAGUDZA, M. M., MAKOV, Y. N., MINASYAN, C. M., 2003, "Frequency-dependent effects of low-intensity ultrasound on activity of isolated heart", *B Exp Biol Med*, n. 3, pp. 239-241.
- POHL, P., ANTONENKO, Y. N., ROSENFELD, E., 1993, "Effect of ultrasound on the pH profiles in the unstirred layers near planar bilayer lipid membranes measured by microelectrodes", *Biochim Biophys Acta*, v. 1152, pp. 155-160.
- PORTER, T. R., XIE, F., 2001, "Therapeutic ultrasound for gene delivery", *Echocardiog*, v. 18, pp. 349-353.
- PRICE, R. J., SKYBA, D. M., KAUL, S., SKALAK, T. C., 1998, "Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound", *Circulation*, v. 98, pp. 1264-1267.
- REDDY, V. Y., REYNOLDS, M. R., NEUZIL, P., RICHARDSON, A. W., TABORSKY, M., JONGNARANGSIN, K., KRALOVEC, S., SEDIVA, L., RUSKIN, J. N., JOSEPHSON, M. E., 2007, "Prophylactic catheter ablation for the prevention of defibrillator therapy", *N Engl J Med*, v. 357, n. 26, pp. 2657-2665.
- RIERA, E., GALLEGO-JUÁREZ, J. A., BLANCO, A., ACOSTA, V.M., 2007, "Power characterization of ultrasonic piezoelectric transducers", In: *Proceedings of the International Congress on Ultrasonics*, Vienna, paper ID 1435, Apr. 9 -13.
- ROBINSON, E. S., BUONO, J. M., 1995, "Effect of continuous wave ultrasound on blood flow in skeletal muscle", *Phys Ther*, v. 75, pp. 145-149.
- ROTA, C., RAEMAN, C. H., CHILD, S. Z., DALECKI, D., 2006, "Detection of acoustic cavitation in the heart with microbubble contrast agents *in vivo*: A mechanism for ultrasound-induced arrhythmias", *J Acoust Soc Am*, v. 120, n. 5, pp. 2958 - 2964.
- RUDENKO, O., SARAVAZAN, A., EMELIANOV, S., 1996, "Acoustic radiation force and streaming induced by focused nonlinear ultrasound in a dissipative medium", *J Acoust Soc Am*, v. 99, n. 5, pp. 2791-2798.
- SÁ, J. N. B., PEREIRA, W. C. A., VON KRUGER, M. A., 2008, "Estudo do padrão de aquecimento gerado por ultrassom fisioterapêutico em *phantom* ultrassônico com matriz de termopares", *21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Salvador, Bahia*, pp. 1143 – 1146.
- SALZ, H. ROSENFELD, E. H., WUSSLING, M., 1997, "Effect of ultrasound on the contraction of isolated myocardial cells of adult rats", *Ultrasound Med Biol*, v. 23, n. 1, pp. 143-149.
- SCHWARTZ, P. J., BILLMAN, G. E., STONE, H. L., 1984, "Autonomic mechanisms in ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia during exercise in dogs with

- healed myocardial infarction. An experimental preparation for sudden cardiac death”, *Circulation*, v. 69, n. 4, pp. 790-800.
- SKRZYPIEC-SPRING, M., GROTHUS, B., SZELAĞ, A., SCHULZ, R., 2007, “Isolated heart perfusion according to Langendorff - Still viable in the new millennium”, *J Pharmacol Toxicol Meth*, v. 55, pp. 113-126.
- SMAILYS, A., DULEVICIUS, Z., MUCKUS, K., DAUSKA, K., 1981, “Investigation of the possibilities of cardiac defibrillation by ultrasound”, *Resuscitation*, v. 9, pp. 233-242.
- SOHAIL, M. R., USLAN, D. Z., KHAN, A. H., FRIEDMAN, P. A., HAYES, D. L., WILSON, W. R., STECKELBERG, J. M., STONER, S., BADDOUR, L. M., 2007, “Management and outcome of permanent pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator infections”, *J Am Coll Cardiol*, v. 49, pp. 1851-1859.
- SONG, J., QI, M., KAUL, S., PRICE, R. J., 2002, “Stimulation of arteriogenesis in skeletal muscle by microbubble destruction with ultrasound”, *Circulation*, v. 106, n. 12, pp. 1550 – 1555.
- TOWE, B. C., RHO, R., 2006, “Ultrasonic cardiac pacing in the porcine model”, *IEEE T Biomed Eng*, v. 53, n. 7, pp. 1446-1448.
- TROHMAN, R. G., KIM, M. H., PINSKI, S. L., 2004, “Cardiac pacing: the state of the art”, *Lancet*, v. 364, pp. 1701–1719.
- TUNG, R., ZIMETBAUM, P., JOSEPHSON, M. E., 2008, “A critical appraisal of implantable cardioverter-defibrillator therapy for the prevention of sudden cardiac death”, *J Am Coll Cardiol*, v. 52, pp. 1111-1121.
- VAN DER WOUW, P. A., BRAUNS, A. C., BAILEY, S. E., POWERS, J. E., WILDE, A. A., 2000, “Premature ventricular contractions during triggered imaging with ultrasound contrast”, *J Am Soc Echocardiog*, v. 13, pp. 288-294.
- WALDO, A. L., CAMM, A. J., DERUYTER, H., FRIEDMAN, P. L., MACNEIL, D. J., PAULS, J. F., PITT, B., PRATT, C. M., SCHWARTZ, P. J., VELTRI, EP., 1996, “Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction”, *Lancet*, v. 348, pp. 7-12.
- WELLS, P. N. T., 1977, *Biomedical Ultrasonics*, London, Academic Press Inc.
- WIJFFELS, M. C., KIRCHHOF, C. J., DORLAND, R., ALLESSIE, M. A., 1995, “Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats”, *Circulation*, v. 92, pp. 1954-1968.

- WONG, S. H., SCOTT, G. C., CONOLLY, S. M., NARAYAN, G., LIANG, D. H., 2006, "Feasibility of noncontact intracardiac ultrasound ablation and imaging catheter for treatment of atrial fibrillation", *IEEE T Ultrason Ferr*, v. 53, n. 12, pp. 2394-2405.
- ZACHARY, J. F., HARTLEBEN, , S. A., FRIZZEL, L. A., O'BRIEN, W. D., 2002, "Arrhythmias in rat hearts exposed to pulsed ultrasound after intravenous injection of a contrast agent", *J Ultras Med*, v. 21, pp. 1347-1356.
- ZAKHAROV, S. I., BOGDANOV, K. Y., ROSENSHTRAUKH, L. V., 1989, "The effect of acoustic cavitation on the contraction force and membrane potential of rat papillary muscle", *Ultrasound Med Biol*, v. 15, pp. 561-565.
- ZEQIRI, B., GELÁT, P. N., HODNETT, M., LEE, N. D., 2003, "A novel sensor for monitoring acoustic cavitation. Part I: concept, theory, and prototype development", *IEEE T Ultrason Ferr*, v. 50, n. 10, pp. 1342-1350.

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



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1517-1, sobre "isolamento de preparações miocárdicas de ratos adultos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Rosana A. Bassani / Prof. Dr. José W. M. Bassani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 28 de abril de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1517-1, entitled "isolation of myocardial preparations from adult rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on April 28, 2008.

Campinas, 28 de abril de 2008.


Profa. Dra. Ana Aparecida Guarnido
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13063-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisaib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

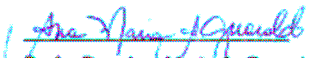
CERTIFICADO


Certificamos que o Protocolo nº 1737-1, sobre "isolamento de preparações miocárdicas de rato adulto", sob a responsabilidade de Rosana A. Bassani / José W. M. Bassani / / Rafael A. Ricardo / Abinoam Marques / Alexandra V. S. Fonseca / Elizângela S. Oliveira / Elaine Belassiano / Marina Monteiro / Everaldo Quelroz / João Guilherme V. Frontão, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 13 de março de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1737-1, entitled "isolation of myocardial preparations from adult rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 13, 2009.

Campinas, 13 de março de 2009.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA (MATLAB)

```
%ANALISE ESTATISTICA DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS - SET/2009
%"Estudo da interacao do ultrassom com o tecido cardiaco"
%Elaine Belassiano Buiochi
%-----
%ANOVA BIFATORIAL
%Fatores: transdutores TA, T1, T3, T6; modos de operacao: 3Hz10%,
5Hz25%/50%, CW.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----
clear all;
close all hidden;
TX = {'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', 'TA', ...
      'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', ...
      'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', ...
      'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', 'T6', };
TXmode =
{'3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '5Hz', '5Hz', '5Hz', 'CW', 'CW', 'CW', 'CW', ...
.'3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '5Hz', '5Hz', 'CW', 'CW', 'CW', 'CW', ...
'3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '5Hz', '5Hz', '5Hz', 'CW', 'CW', 'CW', 'CW', ...
'3Hz10', '3Hz10', '3Hz10', '5Hz', '5Hz', '5Hz', 'CW', 'CW', 'CW'};
TXforce = [1,1,1.06,1,1,1.09,.98,1,.98,.98,.95,...
1,1,.97,1,.99,.95,1,1.02,1,.98,...
1,.99,1,1.02,1,1,1.02,1,.99,.99,1,...
1,1.23,1,1,1.03,1,1,.94,1.02];
TXfreq = [.96,.96,.97,.92,.96,.93,1,1.04,1,1.03,1.17,...
1.03,1,1.03,1.08,.96,1.09,.91,1,1.03,1.08,...
1.03,1,1,.92,1,1.1,.92,1,.96,1.05,1.08,...
1,.84,.92,1,1.09,1,1.03,.74,1.09];

[p,table,stats,terms] = anovan(TXforce,{TX
TXmode},2,3,{'Transducers','Modes'});

if p(1)<=.05
    figure;
    disp 'force TX';
    c01=multcompare(stats,.05,'on','bonferroni','anovan',1)
end

if p(2)<=.05
    figure;
    disp 'force mode';
    c02=multcompare(stats,.05,'on','bonferroni','anovan',2)
end

if p(3)<=.05
    figure;
    disp 'force TX,mode';
    c03=multcompare(stats,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
end
```

```

[p2,table2,stats2,terms2] = anovan(TXfreq,{TX
TXmode},2,3,{'Transducers','Modes'});

if p2(1)<=.05
    figure;
    disp 'frequency TX';
    c21=multcompare(stats2,.05,'on','bonferroni','anovan',1)
end

if p2(2)<=.05
    figure;
    disp 'frequency mode';
    c22=multcompare(stats2,.05,'on','bonferroni','anovan',2)
end

if p2(3)<=.05
    figure;
    disp 'frequency TX,mode';
    c23=multcompare(stats2,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
end

%-----
%ANOVA MONOFATORIAL TA
%Fator: modo de operacao: 3Hz10%, 5Hz25%, CW.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----
TAmode =
{'3Hz10','3Hz10','3Hz10','3Hz10','5Hz25','5Hz25','5Hz25','CW','CW','CW','
CW'};
TAforce = [1,1,1.06,1,1,1.09,.98,1,.98,.98,.95];
TAfreq = [.96,.96,.97,.92,.96,.93,1,1.04,1,1.03,1.17];
[p3,table3,stats3] = anovan(TAforce,{TAmode});

if p3<=.05;
    figure;
    c3=multcompare(stats3,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'TA force';
end;

[p4,table4,stats4] = anovan(TAfreq,{TAmode});

if p4<=.05;
    figure;
    c4=multcompare(stats4,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'TA frequency';
end;

%-----
%ANOVA MONOFATORIAL T1
%Fator: modo de operacao: 3Hz10%, 5Hz25%, CW.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----

```

```

T1mode =
{'3Hz10','3Hz10','3Hz10','3Hz10','5Hz25','5Hz25','CW','CW','CW','CW'};
T1force = [1,1,.97,1,.99,.95,1,1.02,1,.98];
T1freq = [1.03,1,1.03,1.08,.96,1.09,.91,1,1.03,1.08];
[p5,table5,stats5] = anovan(T1force,{T1mode});

if p5<=.05;
    figure;
    c5=multcompare(stats5,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T1 force';
end;

[p6,table6,stats6] = anovan(T1freq,{T1mode});

if p6<=.05;
    figure;
    c6=multcompare(stats6,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T1 frequency';
end;
%-----
%ANOVA MONOFATORIAL T3
%Fator: modo de operacao: 3Hz10%, 3Hz50%, 5Hz50%, CW.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----
T3mode =
{'3Hz10','3Hz10','3Hz10','3Hz10','3Hz50','3Hz50','3Hz50','3Hz50','5Hz50',
'5Hz50','5Hz50','CW','CW','CW','CW'};
T3force = [1,.99,1,1.02,1,1,1.01,1,1,1,1.02,1,.99,.99,1];
T3freq = [1.03,1,1,.92,.97,1,1.05,.92,1,1.1,.92,1,.96,1.05,1.08];
[p7,table7,stats7] = anovan(T3force,{T3mode});

if p7<=.05;
    figure;
    c7=multcompare(stats7,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T3 force';
end;

[p8,table8,stats8] = anovan(T3freq,{T3mode});

if p8<=.05;
    figure;
    c8=multcompare(stats8,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T3 frequency';
end;
%-----
%ANOVA MONOFATORIAL T6
%Fator: modo de operacao: 3Hz10%, 3Hz50%, 5Hz50%, CW.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----
T6mode =
{'3Hz10','3Hz10','3Hz10','3Hz50','3Hz50','3Hz50','5Hz50','5Hz50','5Hz50',
'CW','CW','CW'};

```

```

T6force = [1,1.23,1,1,1.06,1,1,1.03,1,1,.94,1.02];
T6freq = [1,.84,.92,1,1.06,1,1,1.09,1,1.03,.74,1.09];
[p9,table9,stats9] = anovan(T6force,{T6mode});

if p9<=.05;
    figure;
    c9=multcompare(stats9,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T6 force';
end;

[p10,table10,stats10] = anovan(T6freq,{T6mode});

if p10<=.05;
    figure;
    c10=multcompare(stats10,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'T6 frequency';
end;
%-----
%ANOVA MONOFATORIAL TA - CW
%Fator: modo de operacao: CW - 1', CW - 5', CW - 10'.
%Resultados experimentais: força cardiaca e frequencia cardiaca (2
analises).
%-----
TACWmode =
{'CW1','CW1','CW1','CW1','CW5','CW5','CW5','CW5','CW10','CW10','CW10'};
TACWforce = [1,.98,.98,.95,1.07,.94,.87,.91,.89,.8,.82];
TACWfreq = [1.04,1,1.03,1.17,.95,1.08,1.11,1.4,1.2,1.14,1.2];
[p11,table11,stats11] = anovan(TACWforce,{TACWmode});

if p11<=.05;
    figure;
    c11=multcompare(stats11,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'TA CW force';
end;

[p12,table12,stats12] = anovan(TACWfreq,{TACWmode});

if p12<=.05;
    figure;
    c12=multcompare(stats12,.05,'on','bonferroni','anovan');
    disp 'TA CW frequency';
end;

```



```

%-----
%ESTUDO IN VITRO
%ANOVA BIFATORIAL
%Fatores: grupos (experimental e controle); ponto no tempo (logo apos e
15min apos).
%Resultados experimentais: freq.cardiaca e freq.respiratoria (2
analises).
%-----

clear all;
close all hidden;

Group =
{'Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp',...
'Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp',...
'Exp','Exp','Exp','Exp',...
'Control','Control','Control','Control','Control',...
'Control','Control','Control','Control','Control'};

Time = {'0min','15min','0min','15min','0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min','0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min','0min',...
'15min','0min','15min','0min','15min'};

HR = [.712,.685,.828,.83,.832,.748,.764,.705,.871,.789,...
.737,.67,.9,.773,.732,.681,.772,.798,.885,.832,...
.979,.928,1.011,.991,.978,...
.966,1.029,.965,.954,.893];

RR = [.929,.821,.938,.938,.811,.698,1.106,.979,.698,.581,...
.825,.725,.903,.742,.620,.580,.833,.604,.837,.796,...
.849,.774,.977,.886,.975,...
.925,.951,.732,.905,.786];

TE = [.991,.950,.997,.994,.952,.918,.943,.917,.964,.947,...
.969,.943,.984,.968,.924,.891,.979,.958,.951,.934,...
.976,.973,.960,.943,.982,...
.966,.974,.951,.976,.953];

[p,table,stats,terms] = anovan(HR,{Treatment
Time},2,3,{'Treatment','Time'});

figure;
disp 'HR';
c1=multcompare(stats,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Frequencia Cardiaca');
xlabel('valores normalizados')

[p2,table2,stats2,terms2] = anovan(RR,{Treatment
Time},2,3,{'Treatment','Time'});

figure;
disp 'RR';
c2=multcompare(stats2,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])

```

```

title('Bonferroni: Frequencia Respiratoria');
xlabel('valores normalizados')

[p8,table8,stats8,terms8] = anovan(TE,{Treatment
Time},2,3,{'Treatment','Time'});

figure;
disp 'TE';
c8=multcompare(stats8,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Temperatura');
xlabel('valores normalizados')

%-----
%ESTUDO IN VITRO
%ANOVA BIFATORIAL
%Fatores: grupos (experimental e controle); ponto no tempo (logo apos e
15min apos).
%Resultados experimentais: fracao de ejecao e debito sistolico (2
analises).
%-----

Group2 =
{'Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp',...
'Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp','Exp',...
'Control','Control','Control','Control','Control',...
'Control','Control','Control','Control','Control'};

Time2 =
{'0min','15min','0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min','0min','15min',...
'0min','15min','0min','15min','0min',...
'15min','0min','15min','0min','15min'};

EF = [.888,.927,.909,.913,.885,.960,1.011,.960,.996,...
1.014,1.025,.984,.987,1.062,.889,.974,.952,.956,...
.999,1.023,.977,.974,1.040,...
.997,1.000,1.007,.989,1.011];
SV = [.980,1.217,1.111,1.135,.851,.826,1.014,1.050,1.247,...
1.286,1.009,.926,.913,1.055,1.187,1.204,1.231,1.237,...
.992,.812,.946,.899,1.037,...
.924,.909,.802,1.010,.968];
CO = [.693,.831,.920,.944,.709,.618,.884,.828,.920,...
.863,.910,.717,.668,.718,.917,.961,1.090,1.030...
.974,.754,.956,.889,1.015,...
.896,.935,.773,.961,.864];
EDV = [1.104,1.312,1.222,1.243,.962,.860,1.002,1.093,1.251,...
1.268,.985,.941,.925,.994,1.336,1.236,1.294,1.294,...
.992,.794,.968,.922,.997,...
.927,.909,.797,1.021,.958];
ESV = [2.241,2.188,2.514,2.504,1.450,1.012,.945,1.317,1.286,...
1.135,.846,1.027,.962,.812,2.483,1.483,1.554,1.534,...
.995,.730,1.083,1.048,.866,...

```

```

        .935, .908, .773, 1.047, .934];

[p3,table3,stats3,terms3] = anovan(EF,{Treatment2
Time2},2,3,{'Treatment2','Time2'});

figure;
disp 'EF';
c3=multcompare(stats3,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Fração de Ejeção');
xlabel('valores normalizados')

[p4,table4,stats4,terms4] = anovan(SV,{Treatment2
Time2},2,3,{'Treatment2','Time2'});

figure;
disp 'SV';
c4=multcompare(stats4,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Volume Ejetado');
xlabel('valores normalizados')

[p5,table5,stats5,terms5] = anovan(CO,{Treatment2
Time2},2,3,{'Treatment2','Time2'});

figure;
disp 'CO';
c5=multcompare(stats5,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Debito Cardíaco');
xlabel('valores normalizados')

[p6,table6,stats6,terms6] = anovan(EDV,{Treatment2
Time2},2,3,{'Treatment2','Time2'});

figure;
disp 'EDV';
c6=multcompare(stats6,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Volume Diastólico Final');
xlabel('valores normalizados')

[p7,table7,stats7,terms7] = anovan(ESV,{Treatment2
Time2},2,3,{'Treatment2','Time2'});

figure;
disp 'ESV';
c7=multcompare(stats7,.05,'on','bonferroni','anovan',[1,2])
title('Bonferroni: Volume Sistólico Final');
xlabel('valores normalizados')

```


ANEXO 3 – 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: Jan E. Novakofski, Chair
DATE: June 17, 2010
SUBJECT: Approval of Animal Use Protocol

Your animal use protocol submission entitled, "The Interaction of Ultrasound with Cardiac Tissue," was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on June 10, 2010. The IACUC approval number for this protocol is 10104. The Committee does add the following requirements to the protocol:

none

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

This approval is valid for a three-year period, which expires on June 9, 2013. If work will continue beyond the expiration date, a new protocol will need to be submitted and approved by the IACUC prior to June 9, 2013. Additionally, federal regulations and campus policy require annual administrative review of protocols. You will receive notification from the IACUC prior to the deadlines for these reviews as well as for the protocol expiration.

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

leh

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

TO: William O'Brien
FROM: Jan E. Novakofski, Chair
DATE: July 7, 2010
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 July 7, 2010. A summary of the requested changes that have been approved with this amendment is as follows:

The following individual has been added to the protocol personnel: Elaine Belassiano. (The principal investigator is responsible for ensuring adequate training of all individuals.) Jennifer King has been removed as project personnel on this protocol.

The Committee requires that the following stipulation be completed for this work to proceed:

none

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.

leh