

EFEITO CRONOTRÓPICO NEGATIVO EM CORAÇÃO DE RATOS APÓS A APLICAÇÃO DO ULTRASSOM DE ALTA POTÊNCIA

O.C. Coiado*, E. B. Buiochi*, E. T. Costa^{*,**}, R.A. Bassani^{**}, W. D. O'Brien Jr.^{***}

*Departamento de Engenharia Biomédica / Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil

**Centro de Engenharia Biomédica / Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil

***Department of Electrical and Computer Engineering, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, USA

oliviacoiado@hotmail.com

Abstract: High-power ultrasound (HPUS) exposure of rat hearts may affect cardiac function. In this article, we report that thoracic application of HPUS (1 MHz) caused negative chronotropic effect on anesthetized rats, but did not produce gross morphological alterations of lungs and myocardium. The chronotropic effect was achieved by using a specific stimulation pattern in which the pulse repetition frequency was progressively decreased. The magnitude of the chronotropic effect depended on the transducer used. Results suggest that care must be taken during therapeutic use of HPUS, due to its potential effects on heart rate.

Palavras-chave: Ultrassom alta potência, efeito cronotrópico negativo, coração.

Introdução

Um aspecto importante do ultrassom terapêutico é a sua habilidade de produzir efeitos biológicos de forma não-invasiva. Há um uso crescente do ultrassom em terapia médica, sonoforese, trombólise, hipertemia, litotripsia e hemostasia. Dependendo da magnitude e repetição dos parâmetros de exposição, o ultrassom pode interagir de diferentes maneiras com uma variedade de tecidos biológicos, e produzir efeitos aparentemente antagônicos, como restaurar o fluxo sanguíneo (trombólise – baixa intensidade), assim como estancar sangramentos (hemostasia – alta intensidade). Para a mesma intensidade, os efeitos térmicos aumentam com a frequência do ultrassom, enquanto que a presença de cavitação é maior em frequências mais baixas [1]. O ultrassom tem aplicação potencial como uma alternativa a desfibriladores elétricos [2]. Há relatos de que a aplicação do ultrassom pode reduzir o limiar de excitação elétrica [3], embora não tenha sido relatado efeito inotrópico positivo [4].

Um estudo preliminar demonstrou que a aplicação do ultrassom transtorácico pode promover efeito cronotrópico negativo sem alterar a função cardíaca ou danificar o tecido. Esse efeito foi obtido por meio de uma sequência específica de *bursts* ultrassônicos de 1

MHz aplicados diretamente ao coração de ratos, com progressiva diminuição da frequência de repetição de pulso [5].

Em estudo com sapos *in vivo*, observou-se que o ultrassom de alta intensidade em 1,2 MHz causou alterações de ritmo cardíaco [6]. Um estudo em corações isolados perfundidos de rato, estimulado por 30 s com *bursts* de intensidade de 1,52 W/cm² e ação de cavitação acústica mostrou uma significativa diminuição da pressão arterial medida 2 min após a aplicação do ultrassom, enquanto que nenhum efeito do ultrassom foi observado abaixo dessa intensidade. O mesmo estudo mostrou que o coração pode ser excitado ritmicamente por pulsos de ultrassom de duração 50 ms e intensidade até 5 W/cm². Neste mesmo estudo, foi proposto que a cavitação acústica pode induzir lesões locais e reversíveis do miocárdio, o que pode levar à geração de arritmias [7].

O presente artigo mostra os resultados obtidos em experimentos *in vivo* com ratos, com a aplicação de ultrassom com transdutor de alta potência operando na frequência de 1 MHz, nos quais se buscou investigar a influência do ultrassom sobre o coração.

Materiais e Métodos

Animais

As condições experimentais foram aprovadas pela Comissão de Uso e Cuidados de Animais da Universidade de Illinois, IL, EUA (protocolo #10104). Foram usados 10 ratos Sprague-Dawley fêmeas, com aproximadamente 3 meses de idade (Harlan, Indianapolis, IN) que foram expostos a pulsos ultrassônicos de alta potência (1-MHz). Os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano 5% para indução anestésica, e, a seguir, expostos a 1,5-2% isoflurano através de uma máscara facial para manutenção da anestesia. O nível de anestesia era monitorado por meio de teste de reflexos. Além disso, foi monitorada a frequência respiratória, dado que o isoflurano conhecidamente deprime a ventilação.

A pele da região do tórax foi raspada e tratada com creme depilatório para aumentar o contato da superfície

do transdutor com a pele. Nesta região, o transdutor foi acoplado com gel para maximizar a transmissão acústica. Os ratos foram posicionados em uma plataforma sob temperatura controlada, em decúbito dorsal, para exposição ultrassônica. A frequência respiratória, temperatura retal e eletrocardiograma (ECG) foram registrados continuamente antes da aplicação de ultrassom (1 MHz), bem como imediatamente após e 15 min depois da interrupção da estimulação (Figura 1). Em alguns experimentos, os animais foram sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e o coração e os pulmões foram extraídos para análise histológica, que foi realizada por um patologista certificado (i.e., licenciado).

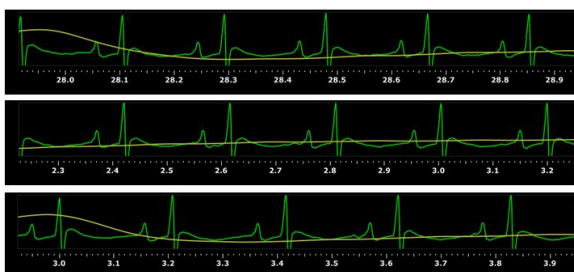


Figura 1: Eletrocardiograma registrado antes (traçado superior), logo após (traçado mediano) e 15 min após (traçado inferior) a aplicação do ultrassom. Observe-se a redução da frequência cardíaca.

Equipamento

Os transdutores de ultrassom foram controlados por um gerador de função (Agilent 33250A). Foram usados dois transdutores de 1 MHz: um desenvolvido no Laboratório de Ultrassom do Departamento de Engenharia Mecatrônica da Universidade de São Paulo, Brasil (experimento A), e um transdutor comercial (Pro Seven 997, Quark Medical, Brasil) (experimento B), do tipo utilizado comumente em fisioterapia. Utilizou-se ainda um amplificador de potência de RF (ENI A 150). O gerador de função e o transmissor externo produziam um campo de ultrassom, aplicado através da superfície externa do tórax do rato. O gerador de função permitia ajuste da frequência do ultrassom, assim como amplitude, duração de pulso e frequência de repetição de pulso (FRP). A fim de minimizar os efeitos térmicos, foi utilizado o seguinte protocolo: *duty cycle* de aproximadamente 1 %, com FRP variável (variando desde ligeiramente acima da frequência cardíaca do rato até 2 Hz abaixo da frequência cardíaca). A estimulação com cada FRP foi efetuada por 10 s (o total de aplicação do ultrassom de alta-potência foi de 30 s com um intervalo de 30 s entre as diferentes FRP), com pico de pressão da rarefação de até 3 MPa [5].

A imagem do coração foi monitorada nos modos B e M por meio de um sistema de imagem de ultrassom de alta frequência (VisualSonics Vevo 2100). A partir das dimensões das câmaras cardíacas, foram estimados os volumes ventriculares diastólico e sistólico finais, cuja

diferença equivale ao volume ejetado. O débito cardíaco foi calculado como o produto de volume ejetado e frequência cardíaca.

Teste t de *Student* para amostras pareadas foi utilizado para comparar os valores das variáveis medidas antes e após a aplicação do ultrassom de alta potência.

Resultados

No experimento A (Tabela 1), em que foi usado um transdutor de alta potência desenvolvido em nosso laboratório, foi observado um efeito cronotrópico negativo (redução de ~20% da frequência cardíaca basal, $p < 0,05$) logo após a aplicação do ultrassom de alta potência (Figuras 1 e 2). Os volumes diastólico final e ejetado aumentaram 10-14%, e o débito cardíaco (Figura 3) foi reduzido em 17%. Porém, essas alterações não atingiram significância estatística ($p > 0,05$), respectivamente. Arritmias de curta duração foram observadas em apenas 2 animais.

Tabela 1: Média e erro médio padrão (EPM) das variáveis medidas no experimento A, imediatamente e 15 min após a aplicação do ultrassom de alta potência (N = 5). Os valores estão expressos como porcentagem do valor basal (pré-estimulação).

Variável	Logo após aplicação US		15 min após aplicação US	
	Média	EPM	Média	EPM
Frequência Cardíaca	80,3%	2,2%	75,1%	2,0%
Débito Cardíaco	85,1%	4,2%	83,4%	4,2%
Volume Ejetado	105,9%	4,2%	110,4%	4,9%
Fração de Ejeção	95,6%	1,9%	97,2%	1,4%
Volume Diastólico Final	111%	4,8%	113,8%	5,4%

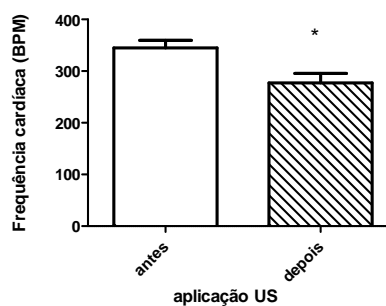


Figura 2: Valores de média e erro médio padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) antes e após ($p < 0,05$) aplicação do ultrassom, no experimento A.

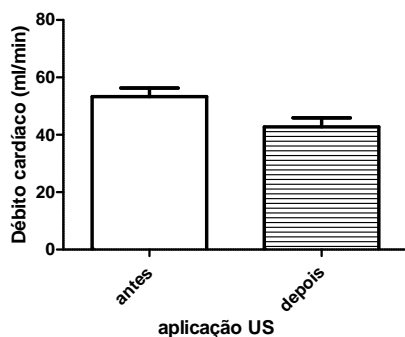


Figura 3: Valores de média e erro médio padrão de débito cardíaco antes e após aplicação do ultrassom, no experimento A.

A aplicação do ultrassom com o transdutor comercial (experimento B, Tabela 2) também causou efeito cronotrópico negativo, embora de menor magnitude (redução de ~10% da frequência cardíaca basal logo após a aplicação do ultrassom; $p < 0,05$; Figura 4). A fração de ejeção e o volume diastólico final não foram significativamente afetados. O débito cardíaco diminuiu ~15% após a aplicação do ultrassom ($p < 0,05$; Figura 5).

Tabela 2: Média e erro médio padrão (EPM) das variáveis medidas no experimento B, imediatamente e 15 min após a aplicação do ultrassom de alta potência (N= 5). Os valores estão expressos como porcentagem do valor basal, pré-estimulação.

Variável	após aplicação US		15 min após aplicação US	
	Média	EPM	Média	EPM
Frequência Cardíaca	91,1%	1,0%	87,6%	0,9%
Débito Cardíaco	85,3%	1,0%	82,5%	0,7%
Volume Ejetado	89,0%	1,3%	97,3%	1,1%
Fração de Ejeção	98,4%	0,9%	98,9%	1,1%
Volume Diastólico Final	90,2%	1,4%	95,1%	1,5%

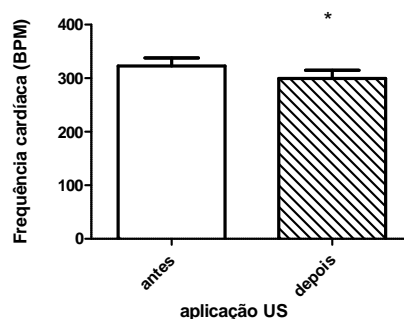


Figura 4: Valores de média e erro médio padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) antes e após ($p < 0,05$) aplicação do ultrassom, no experimento B.

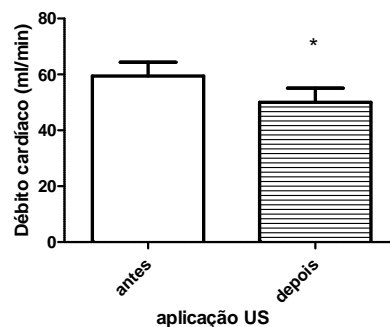


Figura 5: Valores de média e erro médio padrão de débito cardíaco antes e após aplicação ($p < 0,05$) do ultrassom, no experimento B.

A análise histológica do coração e dos pulmões não revelou lesões após o tratamento com ultrassom (Figura 6).

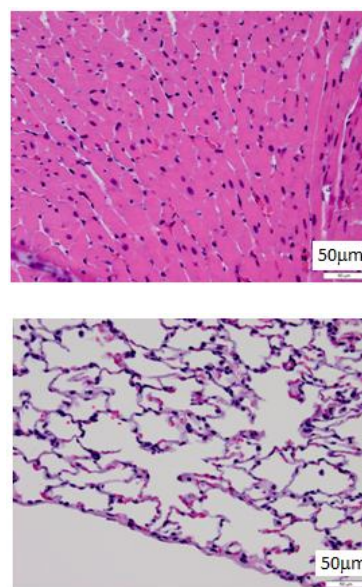


Figura 6: Secções histológicas (magnificação 40x) do coração (acima) e pulmão (abaixo) de ratos expostos à estimulação ultrassônica de 1 MHz.

Discussão

Em ambos os experimentos, foi observado efeito cronotrópico negativo produzido pela aplicação do ultrassom de alta potência. Embora no experimento A este efeito tenha sido praticamente o dobro do observado no experimento B, ele ocorreu para estimulação com ambos os transdutores. Provavelmente devido às diferentes magnitudes do efeito do ultrassom de alta potência, o impacto hemodinâmico foi diferente.

A diminuição da frequência cardíaca aumenta a duração da diástole, o que deve favorecer o enchimento ventricular durante a diástole. Como esperado, no experimento A, houve um aumento, embora não significativo, do volume diastólico final. Por outro lado, este aumento não ocorreu no experimento B, no qual a depressão cronotrópica foi menos acentuada. Espera-se que, pelo mecanismo de Frank-Starling, aumento da pré-carga (i.e., volume diastólico final) resulte em aumento do volume ejetado. Este efeito foi de pequena magnitude. Com a queda da frequência cardíaca, o débito cardíaco foi reduzido em média em 17%, o que, embora não tenha atingido significância estatística, é de magnitude considerável.

Ainda não estão esclarecidos os mecanismos dos efeitos cronotrópicos do ultrassom, o que deve ser abordado em estudos futuros. No entanto, a observação desses efeitos da aplicação torácica de ultrassom numa frequência semelhante àquela comumente empregada em fisioterapia sugere a possibilidade que, dependendo do modo de aplicação, tais efeitos, incluindo tendência de queda do débito cardíaco, possam ocorrer na situação clínica. Isto requer investigação.

Conclusão

Os presentes resultados indicam que a aplicação transtorácica de ultrassom poder ter impacto negativo sobre o fluxo de sangue bombeado pelo coração, por inibição do cronotropismo cardíaco. Estudos adicionais são necessários para esclarecimento da gênese deste efeito, bem como para investigar sua ocorrência durante a aplicação clínica de ultrassom de alta potência.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2008/54165-2) e do *National Institutes of Health* (R37 EB002641). Os autores agradecem a assistência técnica de Rita J. Miller, DVM, Emily Hartman, BS, RDMS and Sandhya Sarwate, MD.

Referências

- [1] Bailey M. R., Khokhlova V. A, Sapozhnikov O. A., Kargl S. G., and Crum L. A. (2003), "Physical Mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound", *Acoustical Physics*, v. 49, n. 4, pp. 369-388.

- [2] Towe B. C. and Rho R. (2006), "Ultrasonic cardiac pacing in the porcine model", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 53, n. 7, pp. 1446-1448.
- [3] Salz H., Rosenfeld E. H., and Wussling M. (1997), "Effect of ultrasound on the contraction of isolated myocardial cells of adult rats", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 23, n. 1, pp. 143-149.
- [4] Petrishchev N. N., Vlasov T. D., Galagudza M. M., Makov Y. N. (2002) "Effect of low-frequency low-intensity ultrasound on contractile function of isolated heart", *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, n. 4, pp. 327-329.
- [5] Belassiano E. B., Miller R., Hartman E., O'Brien, Jr. W. D., Buiochi, F. and Costa E.T. (2011), "The role of ultrasound operation mode for safely interfering in the heart rate". In: *Proceedings of the Pan American Health Care Exchanges Meeting*, PAHCE 2011, 254-259.
- [6] Dalecki, D., Keller, B. B., Raeman, C. H., Carstensen, E. L. (1993), "Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: I. Thresholds for changes in cardiac rhythm and aortic pressure", *Ultrasound in Medicine & Biology*, v. 19, pp. 385-390.
- [7] Zakharov, S. I., Bogdanov, K. Y., Rosenshtraukh, L. V., (1991), "Arrhythmogenic action of acoustic cavitation on the isolated rat heart perfused with physiological saline", *Physiology*, Vol. 111, No. 5, pp. 451-453.