

Raquel Nitrosi de La Fuente

Impacto da preservação parassimpática sobre os
aspectos morfofuncionais cardíacos em ratos
infartados

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Cardiologia.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia
Irigoyen

São Paulo
2008

Raquel Nitrosi de La Fuente

Impacto da preservação parassimpática sobre os
aspectos morfofuncionais cardíacos em ratos
infartados

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Cardiologia.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudia
Irigoyen

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fuente, Raquel Nitrosi de la

Impacto da preservação parassimpática sobre os aspectos morfofuncionais
cardíacos em ratos infartados / Raquel Nitrosi de La Fuente. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientadora: Maria Claudia Irigoyen.

Descritores: 1.Brometo de piridostigmina/administração & dosagem
2.Isquemia miocárdica 3.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-440/08

Dedico esta tese aos meus pais e avós

Meus queridos mestres, que me amaram, me desejaram e me deram oportunidades..... me ensinaram que a vida é uma escola e que temos que vivê-la intensamente com humildade, dignidade, honestidade, pureza, respeito e determinação. A vocês que abdicaram de sonhos, privaram-se de desejos por mim..... Que me acolheram em momentos de dor e me incentivaram, às vezes com um olhar, quando o mundo parecia ruir...O que posso dizer..... Muito obrigada!!! Devo a vocês tudo o que sou e tudo o que construí.... Adoro vocês!!! Minha gratidão e respeito é o mínimo que posso retribuir.

Agradecimentos

Ao Grande Mestre... Deus, por ser generoso e me ofertar a oportunidade de viver e encontrar em minha vida pessoas as quais me fizeram crescer tanto de forma suave quanto mais bruscas... e assim moldar quem sou hoje.

À Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen que me ajudou a trilhar este caminho árduo da pesquisa e do ensino. Acreditou em mim como aluna e pessoa, investindo anos de convivência, dedicação e carinho. Inspiração em momentos difíceis e harmoniosos durante todos estes anos. Um muito obrigada é o mínimo que tenho a dizer.

À Profa. Dra. Silvia Lacchini que desde o início ensinou, orientou e discutiu.... Exemplo de determinação, persistência e conhecimento. Presente nos momentos importantes, apoiando e aconselhando sempre como amiga e professora, obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares que desde o início da minha vida acadêmica esteve presente ensinando e orientando; e hoje, me ajudando na conclusão deste trabalho. Obrigada.

À minha irmã Sofia que sempre esteve presente.... amiga, companheira e conselheira e que me deu um irmão postiço e um amigo querido, meu cunhado Clemilson. Amo vocês!!!

As minhas amigas e irmãos Alessandra, Amanda, Fernanda, Laís e Vivian que em pouco tempo de convivencia se tornaram fundamentais em minha

vida... me ajudam, aconselham e me acolheram nos momentos mais difíceis de minha vida... obrigada!!

À amiga Paula que sempre esteve ao meu lado e incondicionalmente me ajudou, apoiou e aconselhou, uma verdadeira irmã que a vida me deu.

À amiga Thais confidente, carinhosa... e especial, me ajudando e ensinando, é um presente tê-la ao meu lado.

Ao amigo Leandro, uma pessoa especial que me ajudou e me ensinou muitas coisas. Esteve presente nos momentos difíceis e felizes desta caminhada.

Ao amigo Cristiano que me aconselhou, escutou, brigou e acolheu sempre, uma pessoa maravilhosa que considero um irmão.

Aos amigos Bruno, Georgia (“minha filhota”), Ivana e Raquel... sempre dispostos e trabalhadores..... ajudando, e acolhendo sempre, sem eles nada disso seria possível.

À Elenice, minha mãe postiça..... que devo falar!!! Obrigada...

Ao Edson.... meus eternos agradecimentos e respeito.... Obrigada professor por tudo!!!!

À Vera e Fumio (*in memoriam*) por me acolherem, ensinarem, aconselharem, enfim, por tudo..... Amo vocês!!!

Ao pessoal do laboratório pelo socorro e apoio durante a elaboração da tese.

Ao pessoal do biotério por todo o trabalho que eles desenvolvem para que as pesquisas se desenvolvam.

**À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado**

Esta tese esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referencias: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de Sao Paulo. Faculdade de Medicina. Servico de Biblioteca e Documentacao. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragao, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2a ed. Sao Paulo: Servico de Biblioteca e Documentacao; 2005.

Abreviaturas dos titulos de periodicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos e abreviaturas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Controle da pressão arterial	2
1.2 Infarto do miocárdio	5
1.3 Estimulação colinérgica por brometo de piridostigmina	7
2 OBJETIVOS	12
3 MÉTODOS	14
3.1 Animais utilizados	14
3.2 Seqüência experimental.....	14
3.2.1 Seqüência experimental grupo 7 dias de tratamento	15
3.2.2 Seqüência experimental grupo 21 dias de tratamento.....	16
3.2.3 Seqüência experimental grupo 42 dias de tratamento.....	17
3.2.4 Tratamento com Brometo de Piridostigmina	17
3.2.5 Procedimentos cirúrgicos.....	18
3.2.5.1 Indução do infarto.....	18

3.2.5.2 Cateterização da artéria e veia femorais	20
3.2.6 Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca.....	21
3.3 Procedimentos experimentais relativos ao estudo da função ventricular e caracterização hemodinâmica dos grupos estudados (objetivo 1)	23
3.3.1 Cateterização do Ventrículo esquerdo.....	23
3.3.2 Avaliação da pressão intraventricular	24
3.3.3 Medidas morfofuncionais	25
3.3.3.1 Ecocardiografia	25
3.3.3.2 Avaliação histológica da área de infarto	28
3.4 Procedimentos experimentais relativos ao estudo da função autônômica (objetivo 2)	30
3.4.1 Análise de variabilidade das medidas hemodinâmicas	30
3.4.1.1 Análise tempo-frequência da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca	30
3.4.1.2 Avaliação da sensibilidade barorreflexa	35
3.4.1.3 Bloqueio autonômico.....	37
3.4.1.4 Estimulação elétrica do nervo vago.....	40
3.4.1.5 Teste de sensibilidade dos receptores muscarínicos	41
3.5 Análise estatística	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Avaliação hemodinâmica.....	45

4.1.1 Pressão arterial sistólica	45
4.1.2 Pressão arterial diastólica	46
4.1.3 Pressão arterial média	47
4.1.4 Freqüência cardíaca	48
4.2 Estudo da função ventricular e caracterização hemodinâmica.....	49
4.2.1 Avaliação da pressão intraventricular.....	49
4.2.2 Avaliações morfofuncionais	52
4.2.2.1 Função sistólica	52
4.2.2.2 Função diastólica.....	54
4.2.2.3 Morfometria	57
4.2.2.5 Correlação da pressão diastólica final e fração de ejeção.....	59
4.3 Estudo da função autonômica	60
4.3.1 Variáveis hemodinâmicas no domínio da freqüência.....	60
4.3.2 Sensibilidade barorreflexa	65
4.3.3 Avaliação do bloqueio autonômico	67
4.3.4 Estimulação elétrica do vago.....	71
4.3.6 Estimulação química com metacolina	74
5 DISCUSSÃO.....	78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
7 CONCLUSÕES	101
8 ANEXOS	103
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

RESUMO

de La Fuente RN, *Impacto da preservação parassimpática sobre os aspectos morfofuncionais cardíacos em animais infartados [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008, p.129

Neste estudo, testamos a hipótese de que a estimulação colnérica pela administração de piridostigmina, um agente anticolinesterásico reversível, protege o miocárdio submetido à isquemia miocárdica crônica durante 3 tempos de observação: 7, 21 e 42 dias. Para essa avaliação foram medidos a área de acinesia (índice de área de infarto), os índices das funções sistólica e diastólica pela ecocardiografia e por medida direta bem como marcadores da função autonômica como a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA). O bloqueio farmacológico do sistema nervoso autônomo e o estudo da via eferente parassimpática foram também realizados. Utilizou-se ratos Wistar machos divididos em 4 grupos: controle, controle piridostigmina, infartado e infartado piridostigmina.

Os resultados mostraram os efeitos protetores da piridostigmina nos diferentes tempo de infarto com redução da área de acinesia (maior que 80%) tanto pelo ecocardiograma quanto pela histologia. Além disso observou-se recuperação das funções sistólica e diastólica, com normalização da pressão diastólica final e das derivadas de contração e relaxamento. Essas melhoras foram mais consistentes em 21 e 42 dias, sem diferenças entre esses tempos de tratamento. Em 7 dias ainda persistiram alguns índices de disfunção

ventricular, embora a função autonômica estivesse bem preservada. Parte dessa melhora se deve, provavelmente, ao aumento do tônus vagal e redução do simpático. A potenciação da bradicardia pela estimulação elétrica do vago induzida pela piridostigmina confirma seu papel com estimulador colinérgico.

A sensibilidade do barorreflexo reduzida de forma semelhante pelo infarto do miocárdio aos 7, 21 e 42 dias, voltou aos valores controle após o tratamento com piridostigmina, sem diferenças devidas ao tempo de tratamento. Da mesma forma, a variabilidade da FC foi aumentada após o tratamento com o brometo de piridostigmina no grupo infartado o que também ocorreu no grupo controle. Em adição, o aumento da banda de alta frequência e a redução da banda de baixa frequência que refletem respectivamente a modulação parassimpática e simpática da variabilidade da frequência cardíaca, levaram a uma redução no balanço simpato-vagal dos animais infartados tratados.

Em conclusão, a estimulação colinérgica por piridostigmina preserva a função parassimpática protegendo o miocárdio da isquemia induzida por oclusão coronariana, mantendo a função cardíaca e a função autonômica dentro dos valores da normalidade.

Descritores: Ratos Wistar, Infarto do Miocárdio, Brometo de Piridostigmina dosagem & administração, variabilidade de frequência cardíaca, balanço autonômico.

Abstract

de La Fuente RN, Parasympathetic preservation impact in cardiac morphofunctional aspects in myocardial infarcted rats. São Paulo: Medical School, São Paulo University, 2008, p.129

In this study we tested the hypothesis that cholinergic stimulation by pyridostigmine administration, a reversible cholinergic inhibitor, protects the ischemic myocardial in three periods of follow-up: 7, 21 and 42 days. For this evaluation we measured the akinetic area (infarction area indicator), systolic and diastolic indexes by echocardiography and left ventricle direct measurements as well as autonomic function markers, as baroreflex sensitivity and heart rate (HR) and blood pressure (BP) variabilities. Pharmacological blockade of the autonomic nervous system and the study of the efferent parasympathetic pathway were also performed. Male Wistar rats were divided in 4 groups: control, control treated with pyridostigmine, infarcted and infarcted treated with pyridostigmine.

The results showed the protective effects of pyridostigmine in the different periods of infarction, with the reduction of the akinetic area (more than 80%), either by the echocardiography and by histology. Moreover, we observed systolic and diastolic functions recovery, with normalization of the end diastolic pressure and the maximum rates of left ventricle BP rise and fall. These improvements were more consistent in 21 and 42 days, with no differences between these two periods of treatment. In 7-day treatment, some indexes of

ventricular dysfunction remained, although the autonomic function seemed to be preserved. Part of these improvements is probably due to the increase in the vagal tonus and the decrease in the sympathetic tonus. The pyridostigmine effects in the potencialization of the bradycardia induced by vagus nerve electrical stimulation confirms its role as a cholinergic stimulator.

The reduced baroreflex sensitivity by myocardial infarction, which was similar in 7, 21 and 42 days, returned to control values after pyridostigmine treatment, without differences related to treatment extent. Similarly, HR variability was increased after pyridostigmine treatment in the infarcted group, which also occurred in the control group. In addition, the increase in the high frequency band and the reduction in the low frequency band, which reflect, respectively, the parasympathetic and the sympathetic modulation of HR variability, led to the diminishment in the sympatho-vagal balance in the infarcted-treated animals.

In conclusion, cholinergic stimulation by pyridostigmine preserves parasympathetic function, protecting the myocardial against the ischemia induced by coronary occlusion, mantaning cardiac and autonomic functions within normal values.

Descritores: Wistar rats, Myocardial infarction, Pyridostigmine Bromide dose & administration, heart rate variability, autonomic balance.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os diversos fatores relacionados não somente ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares, como também à mortalidade nos indivíduos já portadores de tais doenças ainda não são bem conhecidos (BENER *et al.*, 2004). A abordagem experimental de problemas fisiopatológicos vem contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos nestes processos, particularmente no estudo do comprometimento do sistema nervoso autônomo (SCHWARTZ, 1998). Para tanto, tem sido desenvolvida uma série de ferramentas de análise dos diversos parâmetros cardiovasculares, permitindo o emprego de alguns marcadores de atividade autonômica para o coração para a estratificação de risco coronariano.

Entre os indicadores de risco, os mais empregados são a sensibilidade do barorreflexo e a análise tempo-freqüência dos sinais cardiovasculares, além de manobras farmacológicas para manipulação do controle autonômico para o coração (PAGANI *et al.*, 1986; DE FERRARI *et al.*, 1993; LA ROVERE *et al.*, 2003; VANOLI *et al.*, 1998; VYBIRAL *et al.*, 1993) .

1.1 Controle da Pressão Arterial

O controle da pressão arterial é essencial para a manutenção da perfusão tecidual apropriada e depende de mecanismos humorais e de mecanismos neurais, envolvendo vias aferentes, núcleos centrais e vias

eferentes, além do controle a longo prazo promovido pelos rins (KRIEGER e MICHELINI, 1992; IRIGOYEN *et al*, 2003). A manutenção da função cardíaca normal é obtida através da regulação neural sobre o coração pela integração da atividade do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (CHERYL *et al*, 1999). Além disso, o controle da homeostase cardiovascular é dependente da atuação dos reflexos originados momento a momento pelos pressorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares e sua integração central (MANCIA *et al*, 1994; CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001).

Os pressorreceptores arteriais dão origem a um complexo reflexo constituído por fibras aferentes (nervos do seio carotídeo e depressor aórtico), neurônios de integração central e por fibras eferentes (FRANCHINI & KRIEGER, 1994; CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001). Estas fibras eferentes podem ser simpáticas, projetando-se para o coração e vasos, ou parassimpáticas (nervo vago), projetando-se para o coração. Assim, através do reflexo comandado pelos pressorreceptores aórticos e carotídeos, o sistema nervoso central mantém uma regulação eficiente sobre o débito cardíaco e a resistência periférica, regulando a pressão arterial do indivíduo momento a momento.

A ação tônica inibitória que os pressorreceptores exercem sobre a atividade nervosa simpática, foi comprovada no rato pela deaferentação dos mesmos (desnervação sino-aórtica), determinando um efeito hipertensor agudo, acompanhado de aumento de atividade simpática (KRIEGER, 1964; 1970; IRIGOYEN *et al*, 1988; 1995). Além de seu papel inibitório sobre a

atividade simpática, os pressorreceptores também podem aumentar a atividade parassimpática, participando, dessa forma, da regulação da frequência cardíaca e da pressão arterial, momento a momento. O tônus vagal cardíaco é modulado reflexamente pelos pressorreceptores, sendo estes os principais responsáveis pelo tônus vagal de repouso no animal acordado e respirando voluntariamente, embora os quimiorreceptores e outros reflexos associados à respiração possam também modificar a atividade do vago (DALY, 1995; JORDAN, 1995).

Nas doenças cardiovasculares de uma maneira geral, as alterações da atividade simpática são melhor conhecidas e estudadas do que as da parassimpática, constituindo as mais fortes evidências da disfunção autonômica (FRANCHINI & KRIEGER, 1989). Entretanto, existe um consenso de que a função vagal preservada é benéfica na manutenção da variabilidade da pressão arterial com conseqüente proteção à lesão de órgãos-alvo (SU & MIAO, 2001; BERNI *et al*, 2004), principalmente na isquemia do miocárdio (SCHULTZ, 2001). Da mesma forma, a redução da variabilidade da frequência cardíaca após o infarto agudo do miocárdio pode independentemente identificar pacientes com risco de morte súbita (STEIN & KLEIGER, 1999).

1.2 Infarto do Miocárdio

São muitas as evidências de distúrbios autonômicos nos pacientes com infarto agudo do miocárdio. Já em 1972, Webb e colaboradores, considerando a existência de alterações autonômicas no início do infarto do miocárdio, observaram que 92% dos pacientes apresentavam desequilíbrio autonômico. Estes autores mostraram que a bradicardia e a hipotensão ocorriam em pacientes que apresentavam infarto da parede póstero-inferior do ventrículo esquerdo, onde a ação parassimpática era provavelmente mais atuante. Já pacientes com infarto da parede anterior do ventrículo esquerdo, apresentavam uma maior ocorrência de hipotensão associada à taquicardia, sugerindo que a ação do sistema nervoso simpático era predominante.

A sensibilidade do reflexo pressorreceptor tem sido interpretada como um fator de bom prognóstico após infarto do miocárdio, sugerindo que as variações ocorrem na dependência de uma série de outras influências, como isquemia prévia, ativação de outros receptores, e área e localização do infarto (MARK, 1983). As alterações do sistema cardiovascular nas fases aguda ou crônica do infarto do miocárdio em humanos parecem também depender do controle reflexo da frequência cardíaca exercida pelos pressoreceptores, que se encontra atenuado na fase aguda, retornando ao normal após alguns dias (OSCULATI *et al*, 1990; TAKESHITA *et al*, 1980, LACERDA, 2000; LACERDA *et al*, 2006; KOIKE *et al*, 2006). É importante ressaltar que, mesmo após a normalização do barorreflexo, a atividade parassimpática cardíaca continua

atenuada (GRASSI *et al*, 1999), refletindo na redução da variabilidade da frequência cardíaca (LA ROVERE *et al*, 1994).

Num estudo recente foi demonstrado que a redução da variabilidade da frequência cardíaca é um preditor de mortalidade a longo prazo (até 5 anos) em mulheres de meia idade com doença coronariana após infarto (JANSZKY *et al.*, 2004). Embora a variabilidade de frequência cardíaca dependa tanto do simpático quanto do parassimpático cardíaco, existe um consenso de que o parassimpático, através dos seus efeitos colinérgicos, seja o grande responsável pela manutenção da variabilidade da frequência cardíaca normal. Corroborando essa afirmativa, drogas que produzem exacerbação dos efeitos vagais, como beta-bloqueadores, aumentam de forma significativa as flutuações dos ciclos cardíacos (MALIK M, 1993), enquanto que as que abolem, como a atropina, produzem efeito inverso, reduzindo a variabilidade de frequência cardíaca (TASK FORCE, 1996).

Embora ainda sejam controversas na literatura, existem evidências experimentais de atenuação de resposta da frequência cardíaca durante a estimulação do nervo vago em cães com insuficiência cardíaca, que podem resultar de alterações na liberação, degradação e ligação da acetilcolina ou na atividade da enzima acetilcolinesterase no coração. De fato, drogas com efeitos anticolinesterásicos estão intrinsecamente ligados à ativação de receptores muscarínicos (nas proximidades das terminações nervosas parassimpáticas colinérgicas) ou nicotínicos (responsáveis pelo aumento da

concentração de acetilcolina na placa motora do músculo esquelético ou nos gânglios autonômicos) (BIBEVSKI & DUNLAP, 1999).

Desta forma, pode-se considerar que a administração de algumas drogas parassimpatomiméticas e β -bloqueadoras após infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca leve ao aumento da variabilidade da frequência cardíaca, indicando um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (VYBIRAL *et al*, 1993; LA ROVERE *et al*, 1994).

1.3 Estimulação Colinérgica por Brometo de Piridostigmina

A busca por drogas com ação cardioprotetora, capazes de inibir a ocorrência de eventos cardíacos em situações de estresse ou esforço físico, para a utilização em pacientes portadores de cardiopatias isquêmicas, é de grande relevância. Além disso, torna-se muito interessante a disponibilidade de drogas que possam conferir cardioproteção e que atuem periféricamente, pois é ampla a variedade de quadros clínicos relacionados a cardiopatias, e é também bastante variada a resposta desses pacientes às drogas atualmente disponíveis.

Alguns estudos mostram que a estimulação colinérgica permite um aumento da resposta vagal em pacientes após infarto agudo do miocárdio, onde sabidamente existe uma diminuição da atividade parassimpática (VYBIRAL *et al*, 1993; CASADEI *et al*, 1993; FERRARI *et al*, 1992). Assim,

sabendo-se que a estimulação vagal é capaz de proteger contra episódios de fibrilação ventricular alterando favoravelmente a automaticidade cardíaca (ELIAKIM *et al.*, 1961; WAXMAN *et al.*, 1988) e a refratariedade *in vivo*, (SCHWARTZ *et al.*, 1977; MARTINS e ZIPES, 1980) é bastante provável que drogas com ação parassimpaticomimética possam conferir cardioproteção. Nesse sentido, o uso de agonistas muscarínicos como a metacolina e oxotremorina parece prevenir a ocorrência de arritmias ventriculares durante a isquemia do miocárdio (DE FERRARI *et al.*, 1993). Contudo, existem outros mecanismos para induzir a estimulação colinérgica, como a utilização de inibidores da acetilcolinesterase, entre os quais a piridostigmina (STEPHENSON & KOLKA, 1990; TAYLOR, 1996; ANDRONE *et al.*, 2003).

Estudos em indivíduos sadios demonstraram que o brometo de piridostigmina (ou piridostigmina) produz bradicardia (NÓBREGA *et al.*, 1996), aumenta a variabilidade da frequência cardíaca (REIS *et al.*, 1998), e inibe as respostas hemodinâmicas ao estresse físico (SERRA *et al.*, 1998) e mental (NÓBREGA *et al.*, 1999), sem prejudicar a função miocárdica (PONTES *et al.*, 1998). A piridostigmina é uma droga que inibe reversivelmente a acetilcolinesterase, sendo utilizada no tratamento da *Miastenia Gravis*. Recentemente, vem sendo também utilizada como meio profilático contra intoxicações por armas químicas. A piridostigmina tem como principal característica a atuação na transmissão neuromuscular (NÓBREGA *et al.*, 1996).

A droga tem sua farmacocinética medida através dos níveis plasmáticos, sendo que a meia vida é de aproximadamente de 6 a 8 horas (MARINO *et al*, 1998). A administração do brometo de piridostigmina por via oral produz efeitos de estimulação colinérgica, mas não atua nas respostas hemodinâmicas reflexas (NÓBREGA, *et al*. 1996), já que age periféricamente.

Experimentalmente, em ratos, esta droga atenuou o consumo de oxigênio pelo miocárdio evocado pela estimulação simpática central (GRABE–GUIMARÃES *et al*,1999), indicando que a piridostigmina tem um papel protetor nas alterações cardiovasculares dependentes da hipoatividade vagal ou do desequilíbrio autonômico entre os sistemas simpático e parassimpático sobre o coração. Além disso, dados recentes do nosso laboratório demonstraram que ratos normotensos tratados com Piridostigmina na água de beber por 7 dias apresentam aumento significativo da sensibilidade do barorreflexo (SOARES *et al*, 2004; DE LA FUENTE *et al*, 2007).

Está bem estabelecido que a atividade parassimpática para o coração é reduzida em pacientes com insuficiência cardíaca, sendo este evento importante na patogênese dos distúrbios do ritmo cardíaco. No entanto, não se sabe claramente o que acontece com a modulação dos receptores muscarínicos sobre a função ventricular no infarto agudo do miocárdio. Além disso, faz-se essencial conhecer os efeitos do tratamento crônico com o brometo de piridostigmina, levando à estimulação colinérgica, sobre as alterações autonômicas associadas ao infarto agudo do miocárdio em rato, já que este pode ser um meio cardioprotetor nesta patologia.

Considerando o exposto anteriormente, a hipótese testada é a de que a preservação da função parassimpática pelo bloqueio da degradação de acetilcolina, levando à estimulação colinérgica, é capaz de atenuar a disfunção ventricular e a magnitude da lesão após o infarto do miocárdio.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- 2.1. Avaliar a repercussão da inibição crônica da atividade da acetilcolinesterase por brometo de piridostigmina na função ventricular e nas características hemodinâmicas em diferentes tempos após a oclusão coronariana.
- 2.2. Avaliar a repercussão da inibição crônica da atividade da acetilcolinesterase por brometo de piridostigmina sobre a função autonômica, com foco sobre a função parassimpática.

MATERIAIS E METODOS

3. Métodos

3.1 Animais Utilizados

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, com peso variando entre 200 e 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração. Os procedimentos experimentais seguiram os critérios de ética em experimentação animal, aprovados pela comissão de ética da Instituição. Durante o protocolo, os animais ficaram em número de cinco por caixa, com temperatura entre 22 - 24° C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e com água e comida à vontade.

3.2 Seqüência Experimental

Os animais foram separados em 4 grupos:

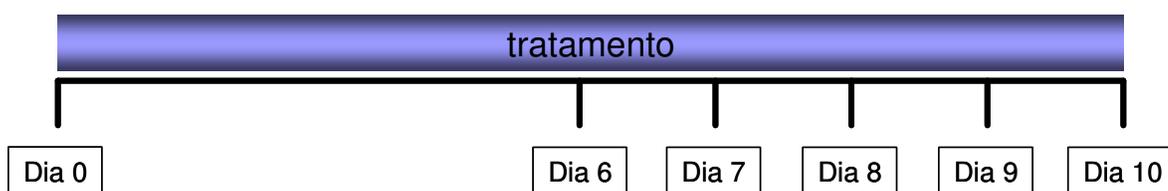
- 1) Controle (C);
- 2) Tratados com Brometo de Piridostigmina (P);
- 3) Infartado (I)
- 4) Infartado Tratado com Brometo de Piridostigmina (IP).

Os grupos experimentais acima mencionados foram estudados após três períodos distintos de tratamento: 7, 21 e 42 dias. É importante ressaltar que,

para os animais infartados, o protocolo iniciou somente quando foi confirmada área de acinesia (por ecocardiografia), 24 horas após o procedimento cirúrgico para induzir o infarto. Também cabe ressaltar que foram considerados para o estudo aqueles com o mínimo de 15% de área de acinesia nas 24 horas. Este dia de confirmação da área de acinesia foi considerado como dia 0 (para todos os tempos estudados).

A seguir, serão apresentados procedimentos comuns a todos os estudos feitos. Posteriormente, serão apresentados os procedimentos usados especificamente para responder aos dois objetivos propostos. Cabe ressaltar que esta seqüência metodológica apresentada será mantida na apresentação dos resultados e na sua discussão.

3.2.1 Seqüência Experimental grupo 7 dias de tratamento



Dia 0: Pesagem e início do tratamento.

Dia 6: Avaliação ecocardiográfica

Dia 7: Canulação artéria e veia.

Dia 8: Registro de pressão arterial e freqüência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa e bloqueio autonômico.

Dia 9: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca (20 min) e inversão do bloqueio autonômico.

Dia 10: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca (5 min) do animal anestesiado, canulação do ventrículo esquerdo, coletas de amostras de sangue estimulação do vago e injeção de metacolina. Perfusão e coleta dos tecidos de interesse.

3.2.2 Seqüência Experimental grupo 21 dias de tratamento



Dia 0: Pesagem e início do tratamento

Dia 20: Avaliação ecocardiográfica

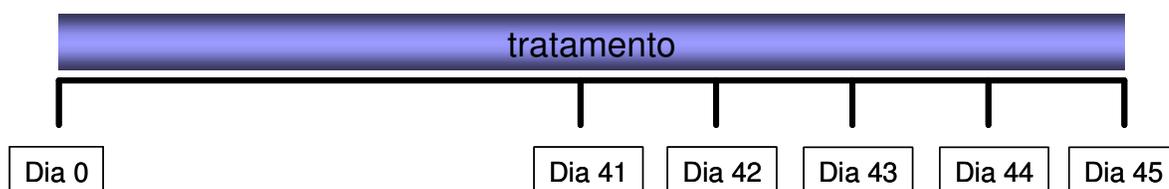
Dia 21: Canulação artéria e veia.

Dia 22: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa e do bloqueio autonômico.

Dia 23: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca (20 min) e inversão do bloqueio autonômico.

Dia 24: Registro de pressão arterial e frequência cardíaca (5 min) do animal anestesiado, canulação do ventrículo esquerdo, coletas de amostras de sangue estimulação do vago e injeção de metacolina. Perfusão e coleta dos tecidos de interesse.

3.2.3 Seqüência Experimental grupo 42 dias de tratamento



Dia 0: Pesagem e início do tratamento

Dia 40: Avaliação ecocardiográfica

Dia 41: Canulação artéria e veia.

Dia 42: Registro de pressão arterial e freqüência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa e do bloqueio autonômico.

Dia 43: Registro de pressão arterial e freqüência cardíaca (20 min) e inversão do bloqueio autonômico.

Dia 44: Registro de pressão arterial e freqüência cardíaca (5 min) do animal anestesiado, canulação do ventrículo esquerdo, coletas de amostras de sangue estimulação do vago e injeção de metacolina. Perfusão e coleta dos tecidos de interesse.

3.2.4 Tratamento com Brometo de Piridostigmina

Nosso Laboratório já tem padronizada a dose efetiva de bloqueio agudo endovenoso com brometo de piridostigmina e a concentração desta droga administrada em água de beber (DE LA FUENTE. *et al*, 2004). O tratamento

foi feito através da administração de solução de Brometo de Piridostigmina (0,14 mg/ mL) por via oral na água de beber, permitindo que os animais ingerissem 40 mg/Kg/dia da droga.

Como mencionado anteriormente, em animais infartados, o tratamento iniciou-se somente depois a confirmação da área de acinesia 24h após realizada a indução do infarto do miocárdio. Como comentado anteriormente, este procedimento é de grande importância na avaliação do curso evolutivo do infarto frente à administração de brometo de piridostigmina, especialmente evitando a inclusão de animais em cujo procedimento de indução de infarto tenha sido ineficiente.

3.2.5 Procedimentos Cirúrgicos

3.2.5.1 Indução do Infarto

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Ketamina (50 mg/ Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) por via intraperitoneal, colocados em decúbito dorsal e entubados (gelco-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele, e os músculos peitorais afastados. O animal foi submetido à respiração artificial (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP) e foi realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para a melhor visualização (figura 1).

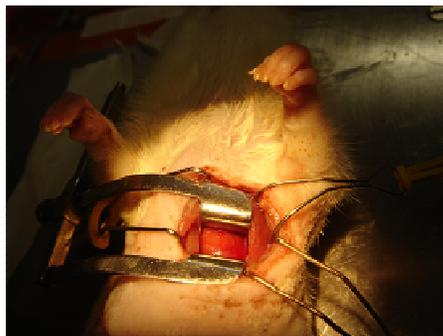


Figura 1 - Observação do ventrículo esquerdo, após a toracotomia e abertura do pericárdio.

O pericárdio foi aberto e o átrio esquerdo afastado para visualização da veia interventricular anterior como referência à artéria. O procedimento para a ligadura da artéria interventricular anterior consistiu na passagem de um fio sob a veia atingindo parte da musculatura, onde se encontra a artéria. Esta foi ligada (fio mononylon 6,0) provocando a isquemia do tecido adjacente (figura 2).

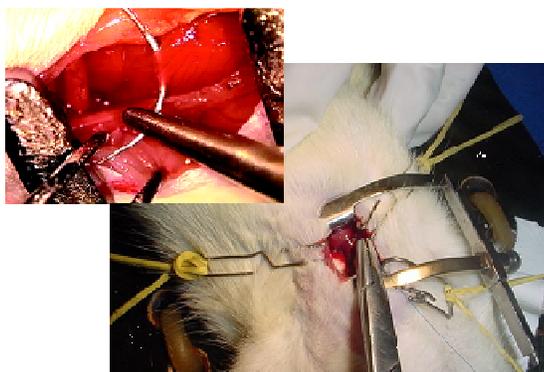


Figura 2 - Procedimento da ligadura da artéria interventricular anterior.

Após a ligadura da coronária, a toracotomia foi fechada (fio mononylon 4,0) e o pneumotórax retirado. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele foi suturada (fio mononylon 4,0). Logo após a recuperação do animal e o início de reflexos suprimidos pela ação dos anestésicos, o animal foi retirado da ventilação artificial e estimulada a respiração, em ambiente aquecido, para recuperação. Foi administrado por via intramuscular de 30000 UI benzilpenicilina.

3.2.5.2 Cateterização de artéria e veia femorais

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (50mg/ Kg) e Xilazina (12mg/kg), colocados em decúbito dorsal, e a tricotomia foi feita na região medial do membro posterior esquerdo. Após a realização da incisão, os cateteres foram inseridos na artéria e na veia femorais, passados subcutâneamente e exteriorizados no dorso do animal, próximo à região cervical.

O intuito da realização deste procedimento foi permitir a aquisição de sinais de pressão arterial (cateter arterial) e a infusão de drogas ou anestésico (cateter venoso) (Figuras 3 e 4).

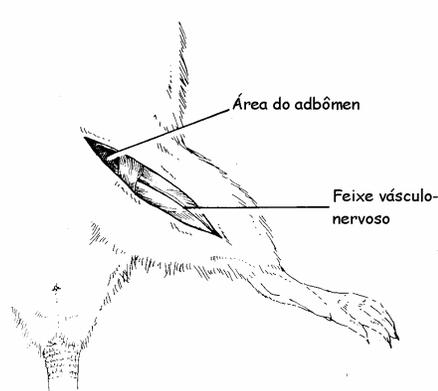


Figura 3 - Sítio de dissecção para a cateterização da artéria femoral

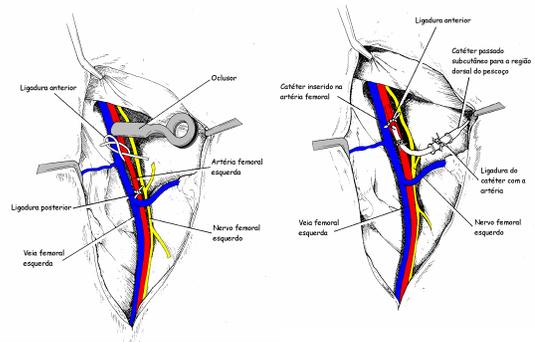


Figura 4 - Isolamento da artéria femoral e inserção do catéter.

Confecção de cateteres para artéria e veia femorais

Os cateteres foram confeccionados em tubos de polivinil *Tygon* (15 cm) tendo uma das extremidades conectada a um outro tubo de polivinil com diâmetro menor (PV – 10). A extensão de PV – 10 utilizada para cânula arterial foi de 5 cm e a extensão para o cateter venoso foi de 4,5 cm.

3.2.6 Medidas de Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

A pressão arterial pulsátil foi obtida diretamente através da conexão do cateter arterial, implantado diretamente na artéria femoral esquerda a um transdutor que transferiu os sinais pulsáteis a um pré-amplificador de pressão (Hewlett-Packard,8805C). A pressão arterial foi analisada batimento a

batimento pelo programa WINDAQ (2Khz, freqüência de amostragem) (figura 5). O programa Windaq permitiu a análise dos pulsos de pressão batimento a batimento, para a obtenção dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC) e criação da série temporal para a avaliação da variabilidade no domínio do tempo e da freqüência.

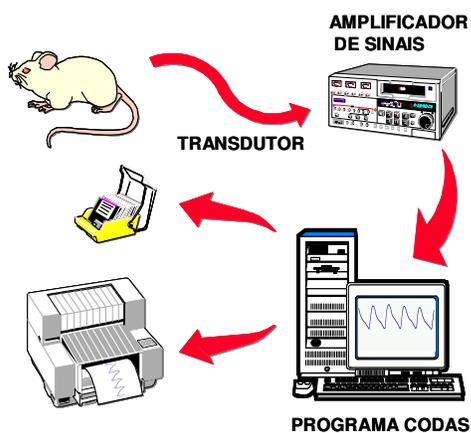


Figura 5 - Representação esquemática do sistema de registro de Pressão Arterial

3.3 Procedimentos experimentais relativos ao estudo da função ventricular e caracterização hemodinâmica dos grupos estudados (objetivo 1)

Os métodos apresentados a seguir correspondem aos utilizados na caracterização hemodinâmica e no estudo da função ventricular direta e indireta.

3.3.1 Cateterização do ventrículo esquerdo

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (40 mg/ Kg) por via endovenosa. A artéria carótida direita foi cateterizada, usando-se um cateter de polivinil (medindo 0,5 e 1 mm de diâmetro interno e externo, respectivamente), com aproximadamente 20 cm de comprimento e preenchido com salina heparinizada. Este cateter foi conectado a um transdutor que transferiu os sinais pulsáteis a um pré-amplificador de pressão (Hewlett-Packard,8805C). A pressão arterial foi analisada batimento a batimento pelo programa WINDAQ (2Khz, frequência de amostragem). Após estabilização da preparação (5 min), o cateter foi avançado até o ventrículo esquerdo, quando foi possível visualizar a onda de pressão pulsátil típica, com

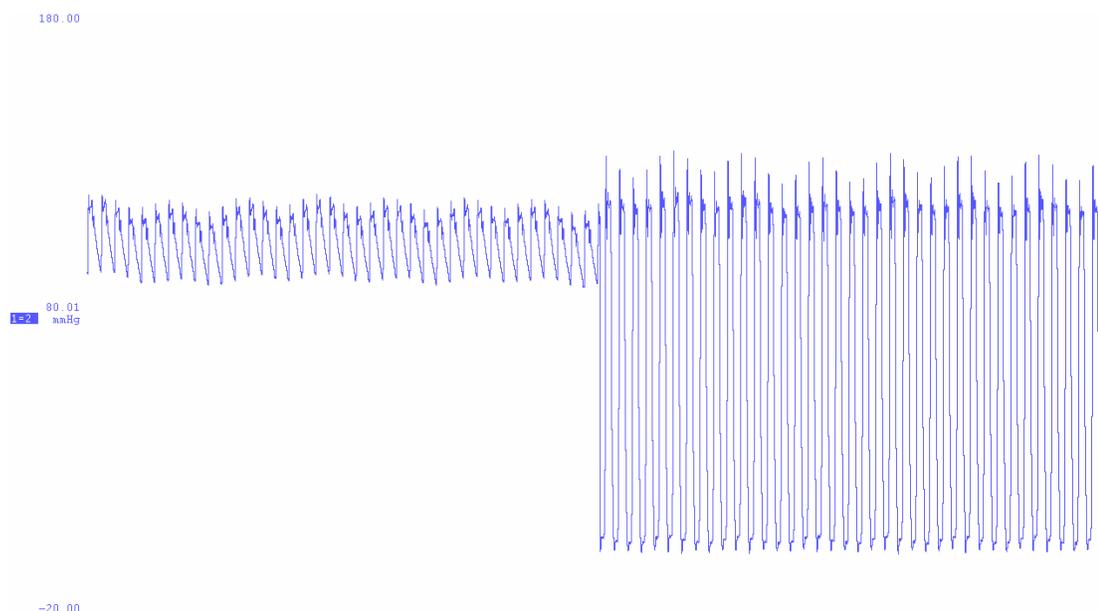


Figura 6 - Exemplo representativo do registro da onda de pressão arterial seguida da onda de pressão intraventricular esquerda.

Confecção de cateteres para ventrículo esquerdo

Foi utilizado um cateter de 7 cm de P50 (1,5 X 5,0 mm) conectado diretamente à extensão do transdutor.

3.3.2 Avaliação da Pressão Intraventricular

A pressão arterial foi analisada batimento a batimento pelo programa (WINDAQ), numa frequência de aquisição de 2000 Hz. Depois que o cateter alcançou o ventrículo esquerdo, foram obtidos registros dos valores diretos da

pressão sistólica e diastólica intra-ventricular em períodos de 5 min cada. A partir do registro da pressão intraventricular, foi possível determinar os valores de pressão diastólica final e inicial e velocidades de contração (dP/dt positiva) e relaxamento (dP/dt negativa) (figura 7).

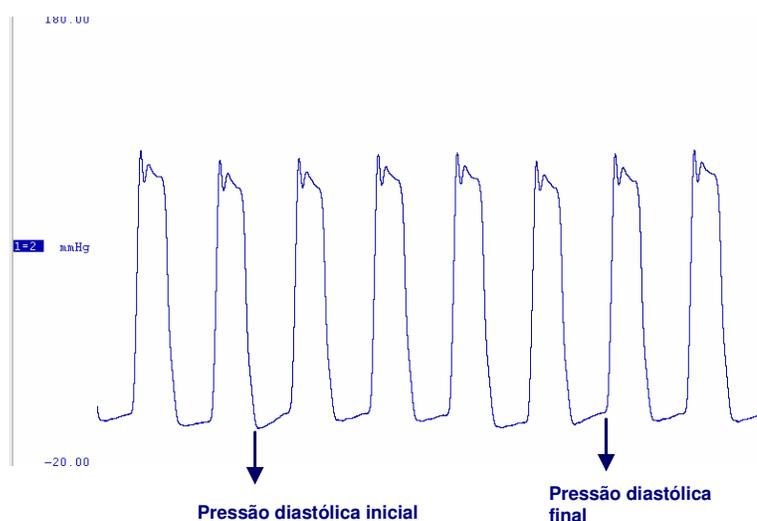


Figura 7 - Figura representativa da pressão intraventricular, pressão diastólica inicial e pressão diastólica final em mmHg.

3.3.3 Medidas Morfofuncionais

3.3.3.1 Ecocardiografia

As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN *et al.*, 1978). Os exames foram realizados por um único observador, e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo

calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com uma solução de Ketamina (50 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg), através de injeção intra-peritoneal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram obtidas a uma frequência de 13 MHz, para otimização da resolução e penetração no tecido, e foram armazenadas para posterior análise.

O ventrículo esquerdo foi visualizado em corte transversal na altura dos músculos papilares para a medida das variáveis funcionais e da área de acinesia.

As variáveis funcionais sistólicas avaliadas foram fração de ejeção e fração de encurtamento, ambas medidas através do uso de cálculos em software específico. As variáveis funcionais diastólicas avaliadas foram o tamanho do átrio esquerdo, medido no modo M (figura 8), e desaceleração do pico E corrigido (obtida através de cálculos apropriados). A medida da área de acinesia (figura 9) foi feita apenas nos grupos infartados, visto que apenas nestes animais se espera encontrar alguma região do ventrículo com alteração de contração. A área de acinesia foi calculada como uma relação percentual entre a área da parede sem contração (acinética) e a área total do ventrículo esquerdo em corte transversal. É importante ressaltar que estas medidas foram feitas com auxílio de um veterinário especializado em cardiologia.

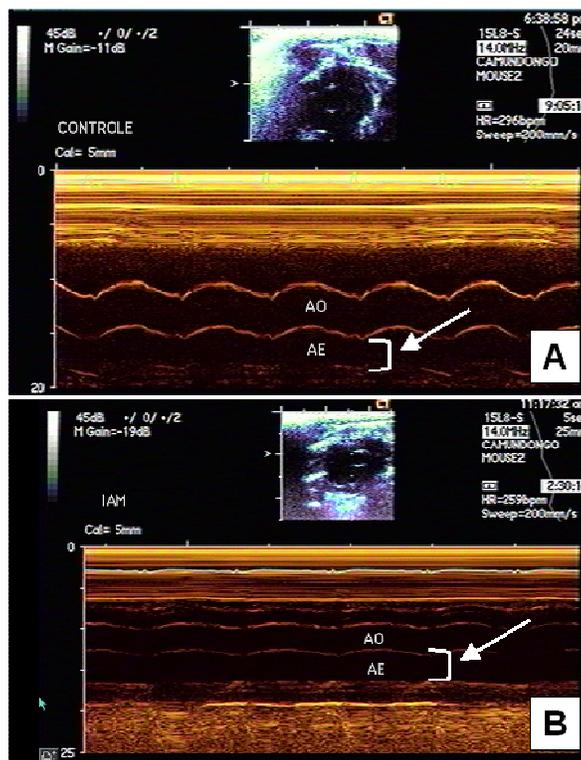


Figura 8 - Imagem representativa de como foi feita a medida do tamanho do átrio esquerdo. Corte transversal do átrio esquerdo, no modo M. Exemplos de medida em coração intacto (A) e infartado (B).

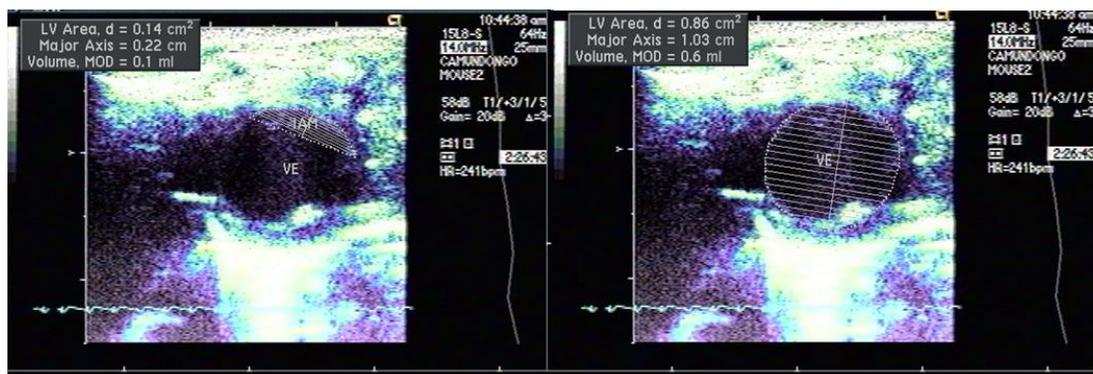


Figura 9 - Imagem representativa de como foi feita a medida da área de acinesia, com auxílio de software específico. A área de acinesia está representada pela área achurada.

3.3.3.2 Avaliação Histológica da Área de Infarto

Coleta do coração e procedimentos histológicos

Os animais foram anestesiados e mortos com Pentobarbital sódico (100 mg/Kg) e heparinizados (25 U/ animal). O tórax foi aberto, cortou-se o átrio direito e perfundi-se o animal através de uma agulha inserida no ventrículo esquerdo. O coração foi parado em diástole pelo uso de solução com cloreto de potássio (14 mmol) em solução fisiológica, perfundido com pressão constante de 80-90 mmHg por um período de 10 a 15 minutos. Após, o animal foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Os tecidos foram deixados de 24 a 48 horas fixando em formol 4% tamponado, foram processados (por desidratação, diafanização e parafinização do material) e posteriormente incluídos em parafina.

Análise da área de infarto

Após a preparação histológica, os corações (porção média do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares) foram cortados em micrótomo (3 μ m), e os cortes dispostos em lâminas e corados para Picrossirius, que cora em vermelho as fibras de colágeno, em contraste com a coloração amarelada das fibras musculares. A avaliação da área de infarto é feita utilizando um

microscópio acoplado a um sistema de digitalização da imagem. A área de infarto é calculada como uma relação percentual da área total. Para cada coração são utilizados cinco cortes. A Figura 10 apresenta um exemplo de uma área de cicatriz observada após a coloração de picrossirius, onde as fibras colágenas da cicatriz se encontram marcadas em vermelho.

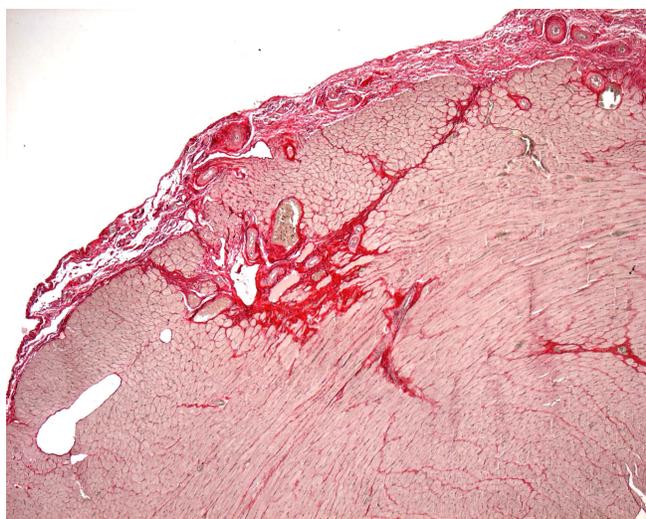


Figura 10 - A Fotomicrografia apresenta um exemplo da coloração de picrossirius no coração, onde se pode ver em vermelho a cicatriz provocada pelo infarto. Aumento: 50X.

3.4 Procedimentos experimentais relativos ao estudo da função autonômica (objetivo 2)

Os métodos apresentados a seguir correspondem aos utilizados na avaliação da função autonômica, tanto pelo estudo direto dos valores de pressão arterial obtidos em todos os animais, como pelo estudo das diferentes vias de regulação autonômica. Nestas, foram estudados: a sensibilidade do reflexo pressorreceptor, o bloqueio autonômico, a estimulação elétrica do vago e a sensibilidade dos receptores muscarínicos.

3.4.1 Análise de Variabilidade das Medidas Hemodinâmicas

3.4.1.1 Análise da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca no domínio da frequência

A análise no domínio do tempo consistiu no cálculo dos valores médios do intervalo de pulso (IP), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD), e das variabilidades do intervalo de pulso, da pressão arterial sistólica e da pressão arterial diastólica foram quantificadas pelo desvio padrão (IP.dp, FC.dp, PAS.dp e PAD.dp, respectivamente), descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Medidas no domínio do tempo selecionadas para estudo da variabilidade de IP, PAS e PAD.

Variável	Unidade	Descrição
IP	ms	Intervalo de pulso
IP.dp	ms	Desvio padrão dos intervalos de pulso
FC	bpm	Frequência cardíaca calculada por $60/IP$ (ms)
FC.dp	bpm	Desvio padrão da FC
PAS	mmHg	Pressão arterial sistólica média
PAS.dp	mmHg	Desvio padrão da média da pressão sistólica

Para a análise no domínio da frequência, foram calculadas as potências para diferentes bandas de frequência. Estas foram obtidas usando-se o Método do Periodograma de Welch, em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (programa MATLAB 6,0, Mathworks, Inc).

As potências para as bandas de muito baixa frequência (MBF: 0,0 - 0,20 Hz), baixa frequência (BF: 0,20 - 0,75 Hz) e alta frequência (AF: 0,75 - 4,0 Hz) foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de BF e AF foram divididas pela variância, subtraída da potência na banda MBF (PAGANI *et al.*, 1986). A Tabela 2 apresenta um sumário das variáveis estudadas no domínio da frequência.

Tabela 2: Índices no domínio da frequência selecionadas para estudo da variabilidade de IP, PAS e PAD.

Variável	Unidade	Descrição	Frequência
Potência total	ms ² ou mmHg ²	Variância ou potência total dos eventos no segmento temporal	-
MBF	ms ² ou mmHg ²	Potência na banda de muito baixa frequência	≈ ≤ 0,20 Hz
BF	ms ² ou mmHg ²	Potência na banda de baixa frequência	0,20-0,75 Hz
BF norm	Unidades arbitrárias	Potência na BF em unidades normalizadas (BF/(total-MBF))*100	0,20-0,75 Hz
AF	ms ² ou mmHg ²	Potência na banda de alta frequência	0,75-4,0 Hz
AF norm	Unidades arbitrárias	Potência na AF em unidades normalizadas AF/(total-MBF)*100	0,75-4,0 Hz
BF/AF	Adimensional	Razão entre BF [ms ²]/AF[ms ²]	

A Figura 11 mostra um sinal simulado como exemplo da transformação do sinal no domínio do tempo para o da frequência, discriminando seus principais componentes. O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foi estimado pela função de coerência. Um valor de coerência (K) maior que 0,5 foi considerado significativo.

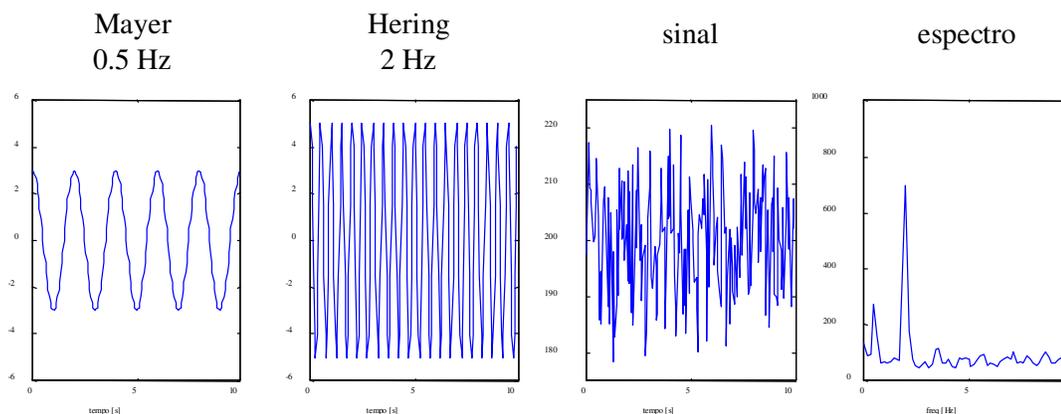


Figura 11 - Figura representativa de um sinal simulado no domínio do tempo e sua transformação para o domínio da frequência. O sinal é composto de um componente oscilatório correspondente às Ondas de Mayer (0,5 Hz) e outro às Ondas de Hering (2 Hz). A transformação pela Transformada Rápida de Fourier discrimina os dois principais componentes em frequência que constituem o sinal.

Na figura 12 estão apresentados os espectros de potência de intervalo de pulso no período controle e após bloqueio farmacológico. Na figura 13 estão representadas as séries temporais de pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP), e na figura 14 estão representados os espectros de potência para IP e coerência.

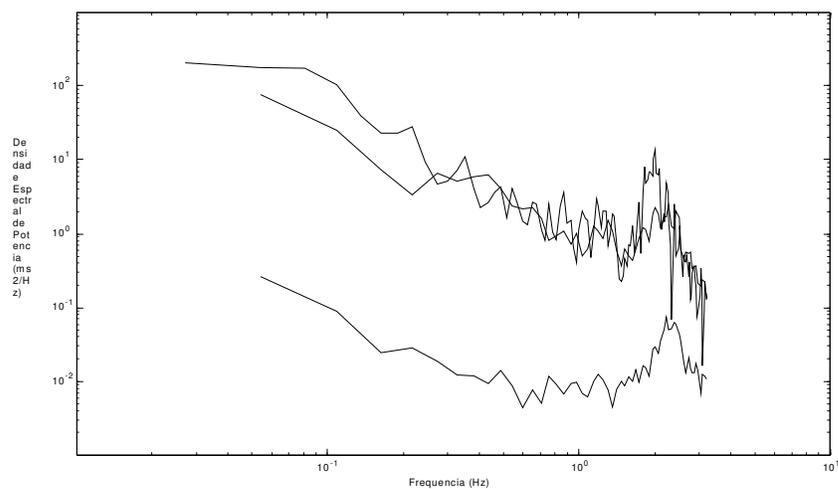


Figura 12: Espectral de potência do intervalo de pulso do controle (-), após administração de propranolol (--) e propranolol+atropina (-.)

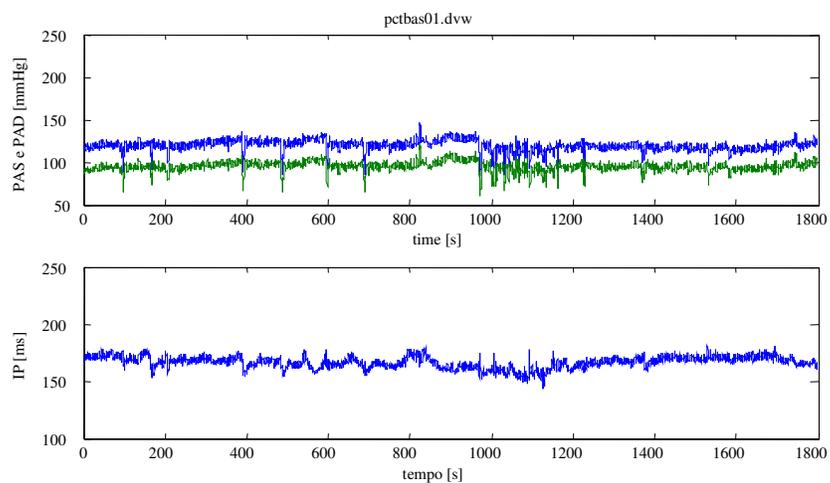


Figura 13: Representação das series temporais.

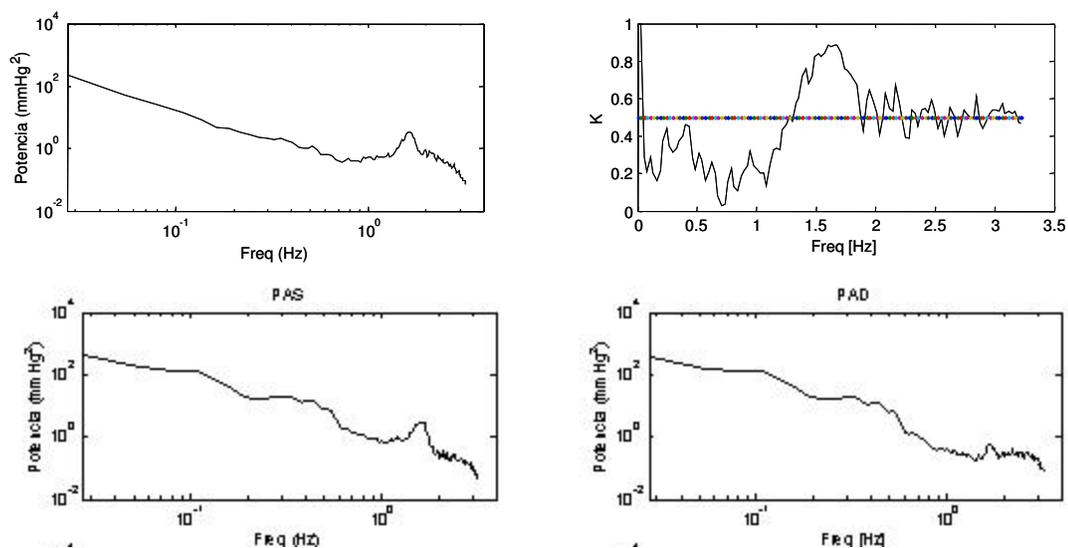


Figura 14: Exemplos representativos dos espectros de potência para os IP (lado esquerdo) e a coerência (lado direito).

3.4.1.2 Avaliação da Sensibilidade Barorreflexa.

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PV10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

Fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, UA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias e cuja ação se deu por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores.

Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade barorreflexa foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Fenilefrina e nitroprussiato foram infundidos randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco.

Os dados foram apresentados em índice de bradicardia e taquicardia reflexa. Estes índices foram calculados pela divisão da variação máxima da frequência cardíaca pela variação máxima da pressão arterial, como ilustrado na figura 15.

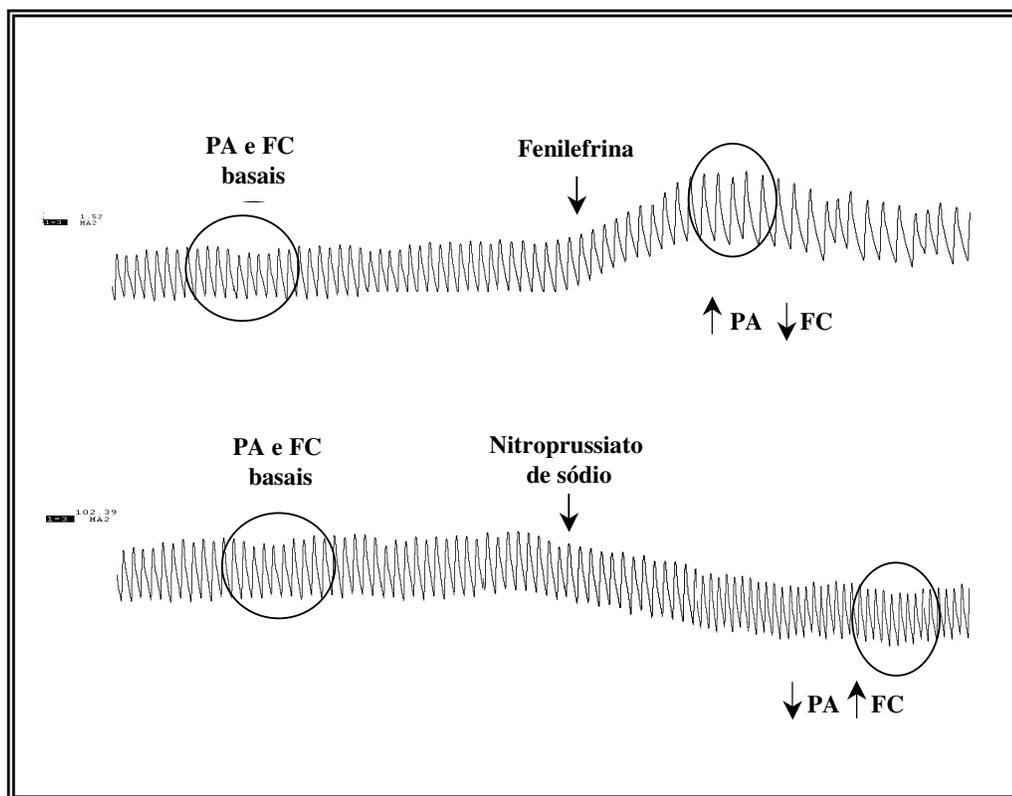


Figura 15 - Esquema ilustrativo da sensibilidade barorreflexa após a infusão de nitroprussiato de sódio (taquicardia reflexa) e fenilefrina (bradicardia reflexa) respectivamente.

3.4.1.3 Bloqueio autonômico

O controle autonômico da frequência cardíaca sobre o coração foi avaliado após o bloqueio farmacológico do sistema nervoso parassimpático e simpático com drogas anti-colinérgicas e beta-bloqueadoras. O bloqueio farmacológico do sistema nervoso parassimpático foi realizado com administração endovenosa de um anti-colinérgico (brometo de metilatropina,

4mg/Kg, Sigma – EUA), verificando-se a pressão arterial e frequência cardíaca após 5 minutos. Já o bloqueio farmacológico do sistema nervoso simpático foi realizado com administração endovenosa de um beta-bloqueador (Propranolol, 4mg/Kg, Sigma – EUA) , verificando-se a pressão arterial e frequência cardíaca após 5 minutos.

A avaliação da participação tanto do sistema nervoso simpático quanto do parassimpático, foi feita em dois dias de estudo. O estudo consistiu de um registro da PA e FC, seguido da infusão de uma das drogas descritas anteriormente (bloqueio simples), seguida da infusão da segunda droga (duplo bloqueio). No dia seguinte, realizou-se o mesmo procedimento invertendo-se a ordem das drogas infundidas.

A frequência cardíaca de repouso (FCR) de cada rato foi considerada como sendo a média das frequências controle nos dois dias de experimento, obtidas antes das injeções. Para o valor de frequência cardíaca atingida por cada droga, foi considerada a resposta máxima de variação da frequência cardíaca após a administração de cada droga. A frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi considerada como sendo a média das frequências cardíacas finais obtidas após o duplo bloqueio farmacológico nos dois dias de experimento. A figura 16 apresenta uma representação de como são vistas FCR e FCI.

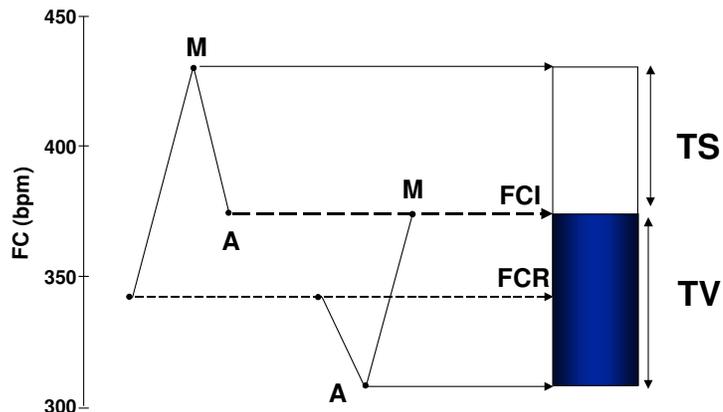


Figura 16 - Esquema demonstrativo do duplo bloqueio farmacológico com metilatropina (M) e propranolol (A) para obtenção da frequência cardíaca intrínseca (FCI), tônus vagal (TV), simpático (TS) cardíaco e frequência cardíaca de repouso (FCR).

Além disso, os valores obtidos com os bloqueios farmacológicos nos dois dias de estudo permitem calcular tanto tônus vagal como simpático e efeito vagal e simpático:

- O tônus vagal foi considerado como sendo a diferença entre a frequência cardíaca intrínseca e a frequência cardíaca mínima atingida após o bloqueio com Propranolol no dia 2.
- O tônus simpático foi considerado como sendo a diferença entre a frequência cardíaca máxima obtida após o bloqueio com Metilatropina no dia 1 e a frequência cardíaca intrínseca (figura 16).

3.4.1.4 Estimulação elétrica do nervo vago

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (40 mg/kg), por via endovenosa. O animal foi colocado em decúbito dorsal e a tricotomia feita na região cervical anterior. Foi feita uma incisão mediana com o intuito de isolar o feixe vaso-nervoso. Após o isolamento, separou-se o nervo vago direito da artéria carótida cuidadosamente para não lesionar o nervo a ser estudado. O nervo isolado foi seccionado e o segmento distal foi apoiado sobre um eletrodo que transmitiu impulsos elétricos em intervalos marcados (7s de estimulação) em frequências distintas (seqüências de 2, 4, 8 e 16, Hz, em pulsos de 2-ms na voltagem de 5V). Todas as alterações foram identificadas através do registro de pressão arterial e frequência cardíaca (bradicardia induzida) (figura 17).

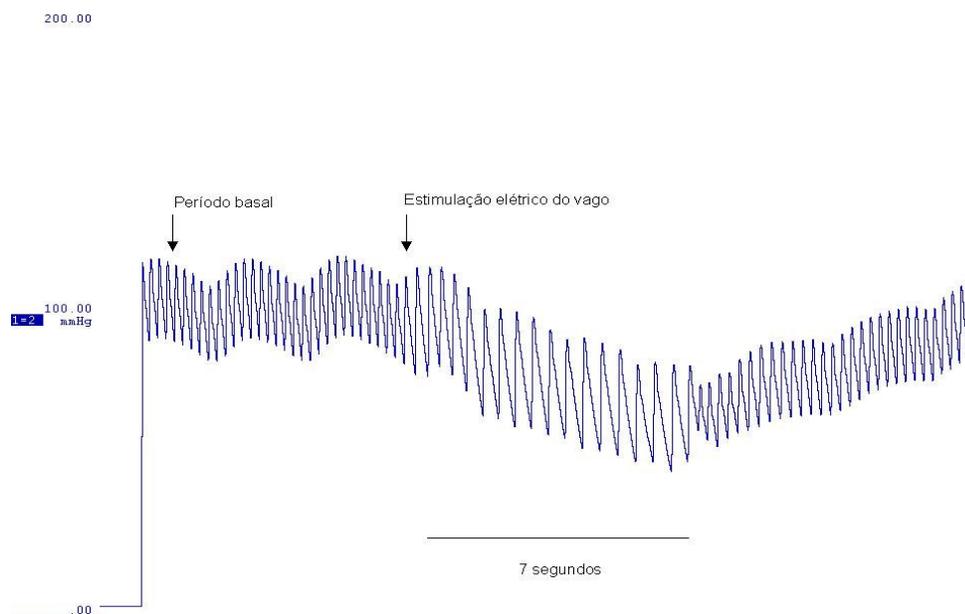


Figura 17 - Exemplo representativo de uma estimulação elétrica do vago de um animal controle. Após um registro basal de pressão arterial o nervo vago direito foi estimulado a freqüência de 16 Hz, em pulsos de 2 ms, intensidade de 5 V e duração de 7 segundos.

3.4.1.5 Teste de sensibilidade dos receptores muscarínicos

Foi considerado como índice de sensibilidade de receptores muscarínicos as alterações de freqüência cardíaca (bradicardia) provocadas pela administração de metacolina por via endovenosa em doses progressivas (1,25 μ g; 2,5 μ g e 5 μ g) (figura 18).

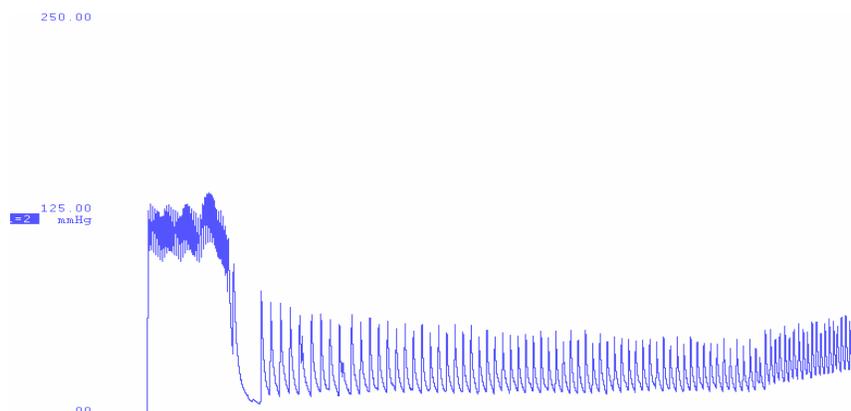


Figura 18 - Exemplo representativo de uma estimulação colinérgica com metacolina em animais tratados com piridostigmina (2.5 µg).

3.5 Análise estatística

Os valores dos grupos, para cada parâmetro avaliado, são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) multifatorial (3 fatores), usando o programa STATISTICA 6.0, com teste *post hoc* de Student Newman Keuls, sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. No caso das correlações, foi realizada Correlação de Pearson, sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

4. Resultados

Os resultados estão apresentados pela avaliação hemodinâmica no domínio do tempo e da frequência, pela análise morfuncional cardíaca e pela avaliação autonômica realizadas nos períodos de 7, 21 e 42 dias nos grupos de animais controle (C), controles tratados com piridostigmina (P), infartado (I) e infartado tratado com piridostigmina (IP).

Número de animais por grupo

A análise foi realizada nos grupos e tempos mencionados, como apresentado no quadro a seguir:

Quantidade de animais usados para cada grupo e respectivo tempo de estudo

	7 dias	21 dias	42 dias
Controle (C)	n=6	n=6	n=13
Piridostigmina (P)	n=12	n=14	n=12
Infartado (I)	n=7	n=9	n=11
Infartado com piridostigmina (IP)	n=9	n=12	n=15

4.1 Avaliação hemodinâmica

4.1.1 Pressão Arterial Sistólica

A figura 19 e tabela 3 (apresentada em anexo) apresentam os dados de pressão arterial sistólica (PAS) em todos os grupos nos períodos de 7, 21 e 42 dias. Os dados apresentados mostram que a PAS não se altera após o tratamento com brometo de piridostigmina, nos animais não infartados, em todos os tempos estudados. Como já descrito anteriormente para a PAM, o infarto do miocárdio reduz também a PAS, em todos os tempos avaliados. É interessante observar que após o tratamento com piridostigmina, os animais infartados apresentam valores de PAS semelhantes aos controles.

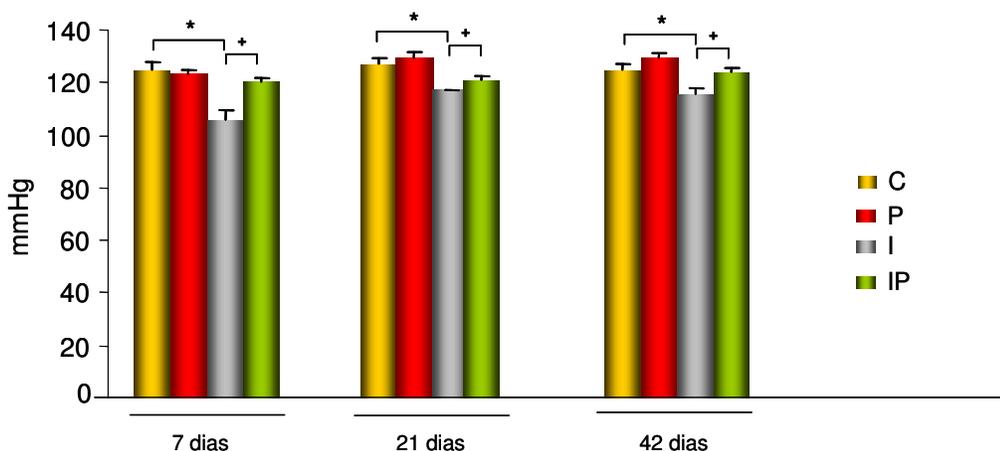


Figura 19 - Valores de PAS nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, # vs CP, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.1.2 Pressão Arterial Diastólica

Os dados de pressão arterial diastólica (PAD) são apresentados na figura 20 e tabela 4 (apresentada em anexo) em todos os grupos estudados nos períodos de 7, 21 e 42 dias. Como ocorreu com a PAS e a PAM, os dados obtidos mostram que o tratamento com piridostigmina *per se* novamente não altera a PAD nos controles. Da mesma forma, a PAD encontra-se reduzida nos infartados. Entretanto, no grupo IP, não observamos alteração induzida pelo tratamento em nenhum dos tempos nem relação aos infartados.

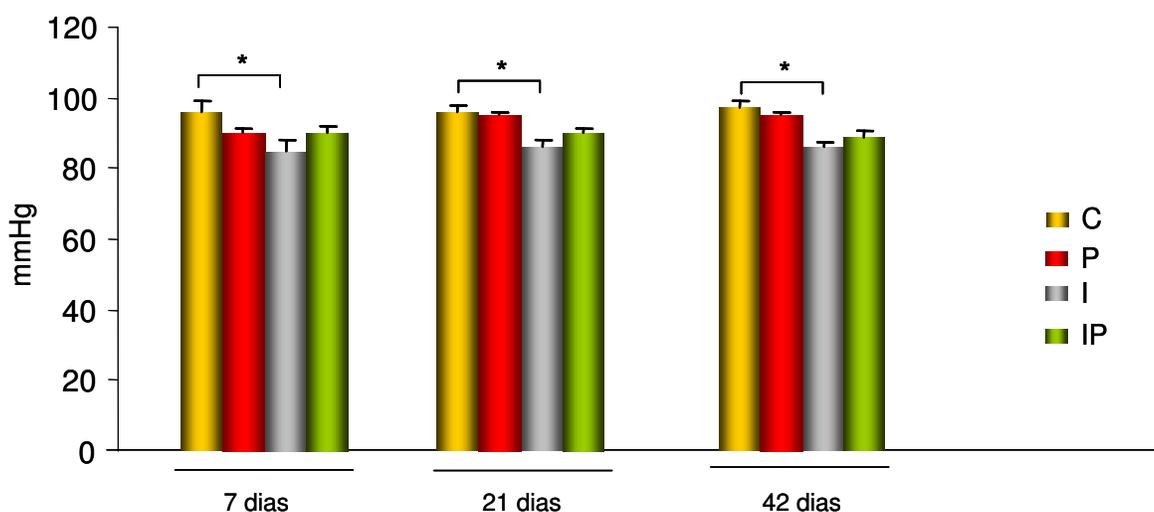


Figura 20 - Valores de PAD nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias. (* vs C, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.1.3 Pressão Arterial Média

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos nos diferentes tempos de estudo, optou-se pela apresentação dos mesmos em uma figura e uma tabela. A figura 21 e tabela 5 (apresentada em anexo) apresentam os dados de pressão arterial média (PAM) em todos os grupos nos períodos de 7, 21 e 42 dias. Observou-se que após o infarto do miocárdio houve uma redução significativa da PAM em todos os tempos estudados. O tratamento com piridostigmina, *per se*, não altera a PAM no grupo controle; entretanto, quando administrada, após infarto, leva à restauração da PAM para valores de normalidade, em todos os tempos estudados, como observado na PAS.

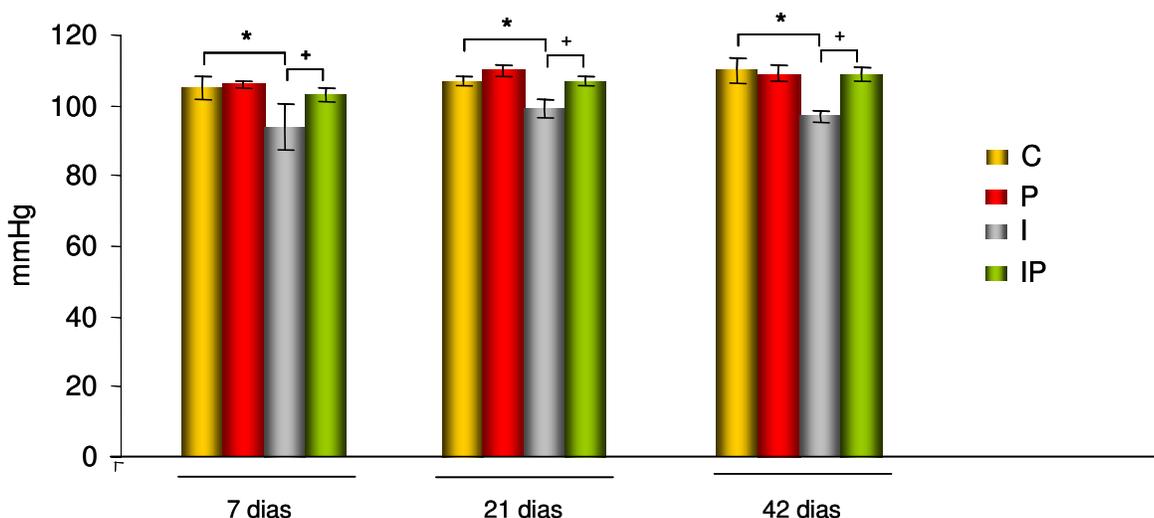


Figura 21 - Valores de PAM nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.1.4 Freqüência Cardíaca

Os dados obtidos (apresentados na figura 22 e tabela 6, em anexo) mostram que os valores de freqüência cardíaca (FC), nos animais controles tratados, não apresentavam alterações significativas em 7, 21 e 42 dias quando comparados a controles não tratados. Após o tratamento com piridostigmina somente observa-se bradicardia após 42 dias de tratamento. Em animais infartados, observou-se uma redução da freqüência cardíaca, ao passo que após o tratamento esta retornou a valores semelhantes aos encontrados em animais controle.

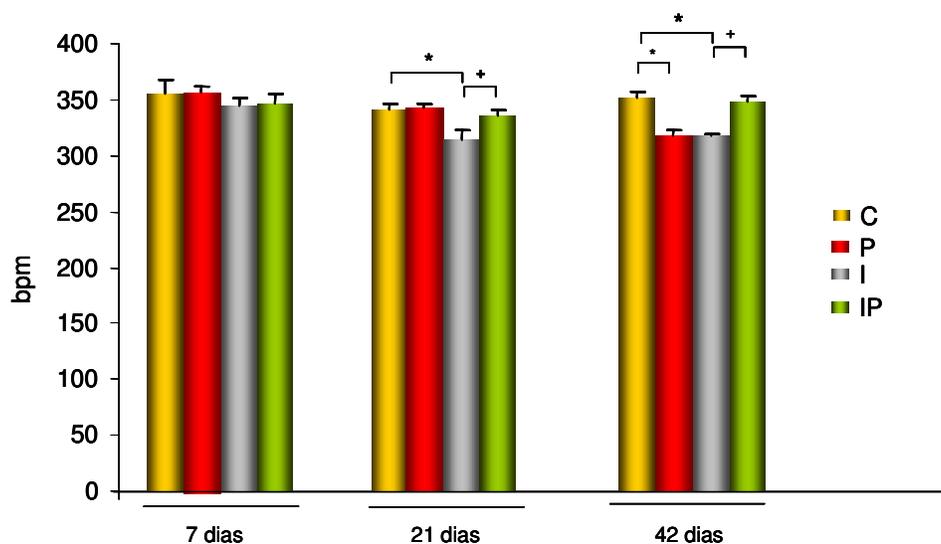


Figura 22 - Valores de FC nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.2 Estudo da função ventricular e caracterização hemodinâmica

4.2.1 Avaliação da Pressão Intraventricular

Pressão Diastólica Final

A pressão diastólica final (PDF) está apresentada na figura 23 e na tabela 7 (apresentada em anexo). Observou-se que a PDF não se alterou após o tratamento de controles com piridostigmina quando comparados com controles não tratados. Em animais infartados, o aumento esperado na PDF foi reduzido após tratamento com Piridostigmina por 21 e 42 dias. Contudo, no período de 7 dias, os valores de PDF foram semelhantes àqueles encontrados em animais infartados não tratados.

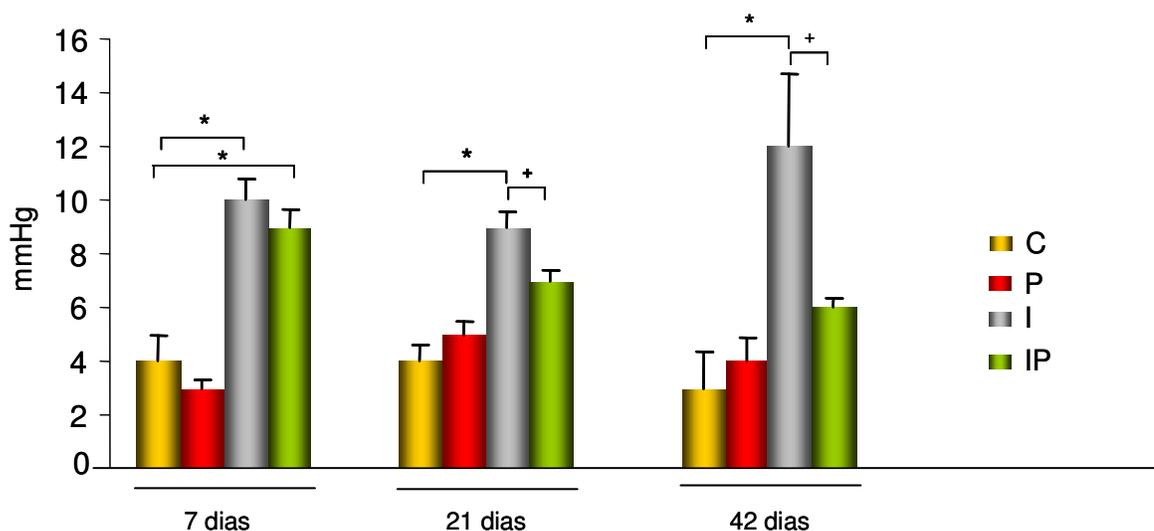


Figura 23 - Valores de PDF nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias. (* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Velocidade de contração e relaxamento cardíaco

Os dados de velocidade de contração (dP/dt positiva) e relaxamento (dP/dt negativa) serão apresentados nas figuras 24 e 8 (apresentada em anexo) e tabelas 25 e 9 (apresentada em anexo), respectivamente.

Pode-se observar que os animais infartados, inicialmente (7 dias), apresentaram uma redução da dP/dt positiva que ao longo do tempo (21 e 42 dias) retornou a valores semelhantes aos animais controles. Já a administração de brometo de piridostigmina, em 21 e 42 dias, foi capaz de melhorar a velocidade de contração cardíaca.

Quanto à velocidade de relaxamento cardíaco, os animais infartados apresentaram os valores reduzidos em todos os tempos estudados, embora em 7 e 42 dias ela esteja um pouco maior. A administração de brometo de piridostigmina após o infarto foi capaz de melhorar a dP/dt negativa em tempos maiores de administração (21 e 42 dias).

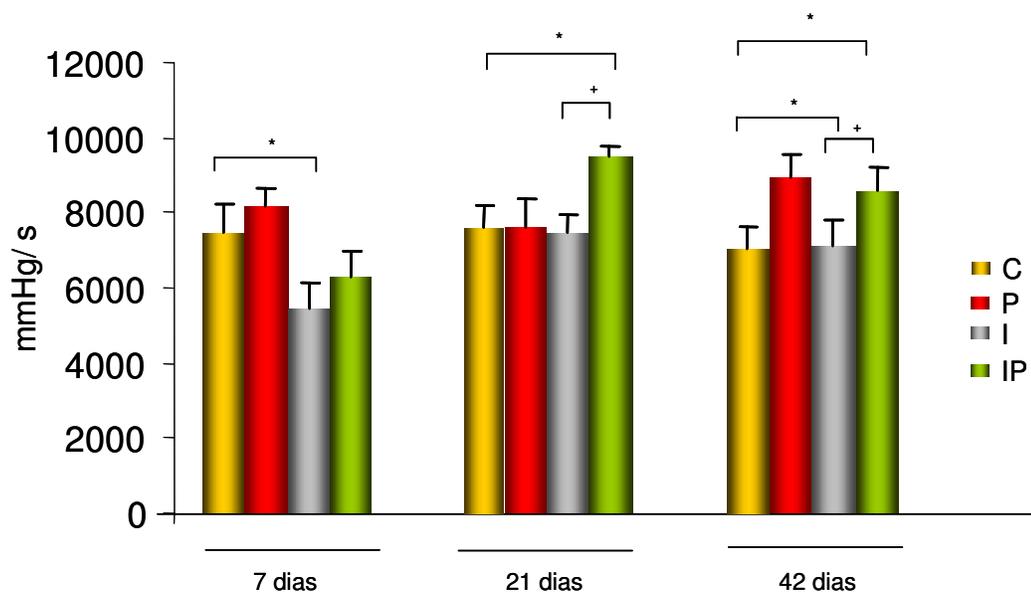


Figura 24 - Valores de dP/dt positiva nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias. (* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

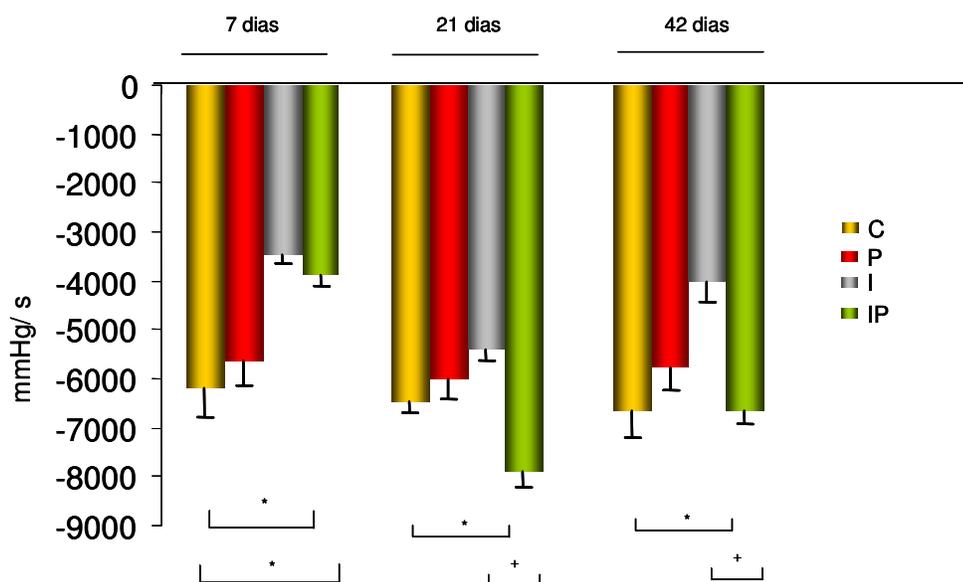


Figura 25 - Valores de dP/dt negativo nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias. (* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.2.2 Avaliações Morfofuncionais

Serão apresentados, a seguir, valores obtidos para as variáveis estudadas, como área de acinesia, fração de ejeção, peso do ventrículo esquerdo (corrigido pelo peso corporal) e medida histológica da área de infarto.

4.2.2.1 Função sistólica

Fração de Ejeção

Os valores apresentados na figura 26 e tabela 10 (apresentada em anexo) mostram a fração de ejeção encontrada após a ligadura da artéria coronária descendente anterior. Em animais infartados observou-se que, como esperado, há uma redução dos valores de fração de ejeção. Já o tratamento melhora estes valores após o infarto, em períodos mais longos (21 e 42 dias). O tratamento no grupo não infartado não alterou essa variável em relação ao grupo controle.

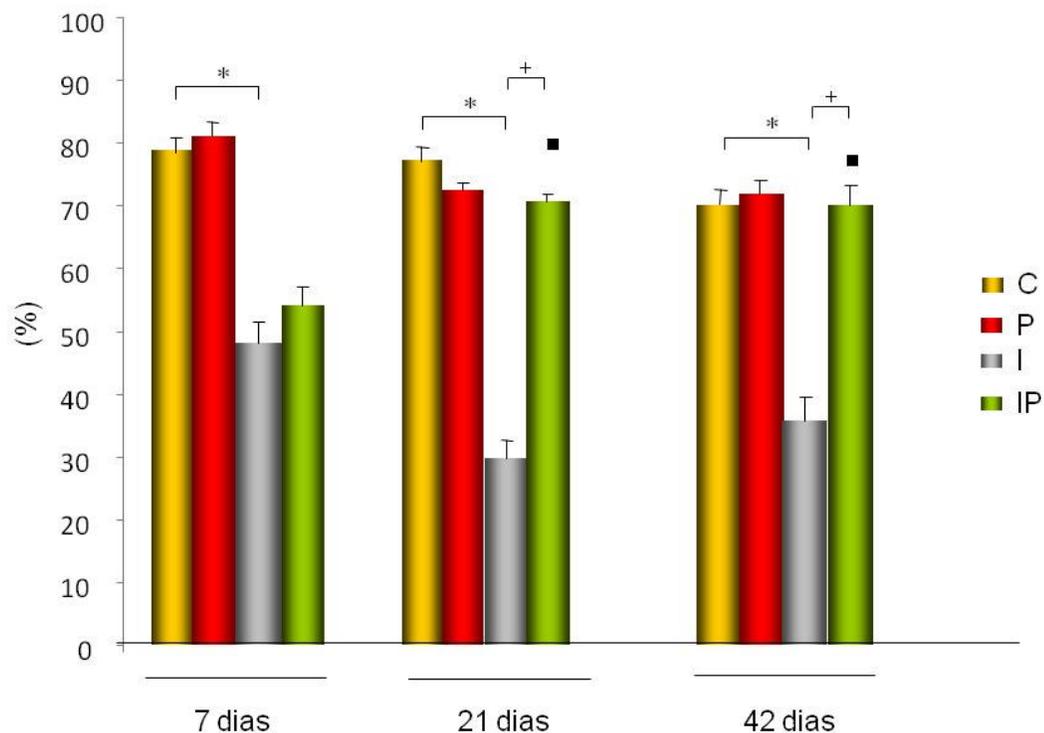


Figura 26 - Valores de fração de ejeção nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP), nos tempos de 7, 21 e 42 dias (%). (* vs C, + vs I, * vs I7dias, * * + $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Fração de Encurtamento

Os valores apresentados na figura 27 e tabela 11 (apresentada em anexo) mostram a fração de encurtamento encontrada após a ligadura da artéria coronária descendente anterior. Em animais infartados, observou-se que há uma redução da fração de encurtamento, mais pronunciada aos 21 e 42 dias, corroborando com os valores de fração de ejeção. Por outro lado, o tratamento melhora a fração de encurtamento em todos os tempos de tratamento, corroborando com a melhora da fração de ejeção. Ainda, o

tratamento no grupo não infartado não levou a modificações em relação ao controle.

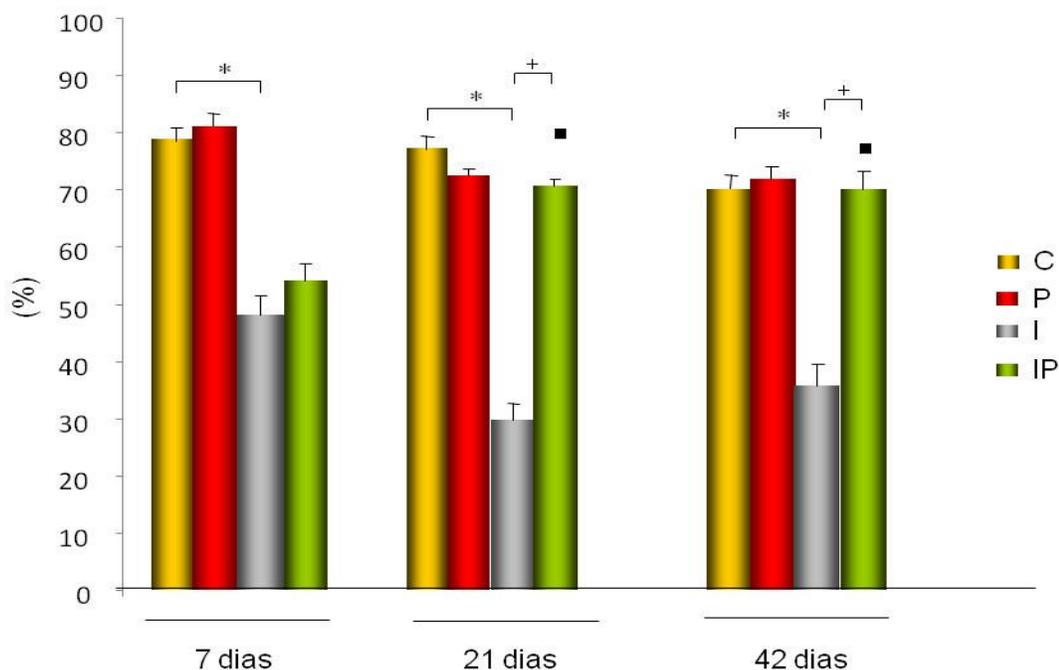


Figura 27 - Valores de fração de encurtamento corrigido nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias em (%). (* vs C, + vs I, * vs I7dias, *** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.2.2.2 Função Diastólica

Tamanho do átrio esquerdo

Os valores apresentados na figura 28 e tabela 12 (apresentada em anexo) mostram as medidas de tamanho do átrio esquerdo (AE). Como se sabe que o volume de sangue encontrado no átrio depende da capacidade de ejeção do ventrículo, espera-se um aumento desta câmara quando o

ventrículo esquerdo reduz sua capacidade funcional, aumentando o volume de sangue tanto no ventrículo como no átrio (esquerdos). A avaliação revelou um aumento no tamanho do AE após o infarto em todos os tempos, sendo mais pronunciado em 7 e 21 dias. Interessantemente, o tratamento com piridostigmina aboliu este aumento, refletindo a melhora da função ventricular nestes animais. O tratamento no grupo não infartado não levou a modificações em relação ao controle.

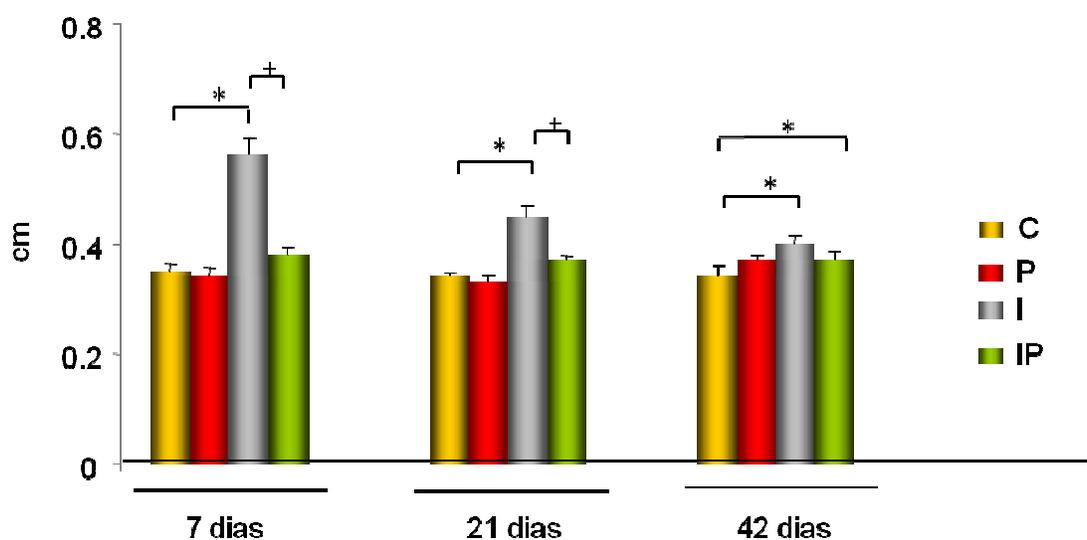


Figura 28: Valores do tamanho do átrio esquerdo corrigido nos infartados (I), Infartados tratados (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (cm). (* vs C, + vs I, ++ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Desaceleração

Os valores apresentados na figura 29 e tabela 13 (apresentada em anexo) mostram a desaceleração medida nos grupos estudados. Em animais infartados, observou-se que há uma redução da desaceleração, mais pronunciada aos 21 e 42 dias, mostrando uma redução da eficiência do ventrículo não só em contrair, mas também em relaxar. Por outro lado, o tratamento melhora esta desaceleração nos animais infartados, especialmente em 21 e 42 dias. O tratamento no grupo não infartado não levou a modificações em relação ao controle.

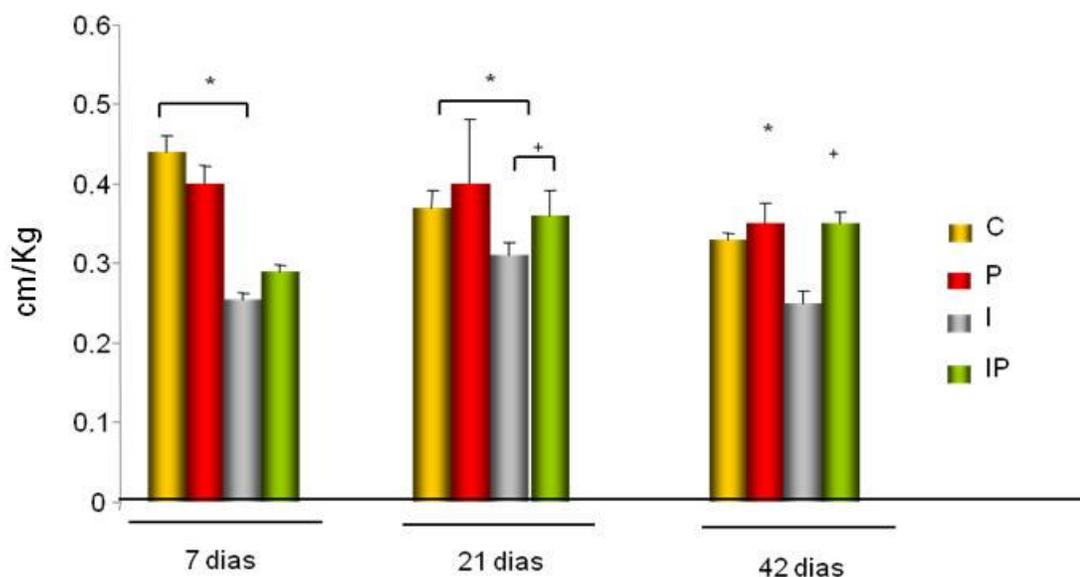


Figura 29 - Valores de desaceleração corrigidos nos infartados (I), Infartados tratados (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (cm/Kg). (* vs C, + vs I, *+ $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.2.2.3 Morfometria

Área de Acinesia

Os valores apresentados na figura 30 e na tabela 14 (apresentada em anexo) mostram a área de acinesia encontrada após a ligadura da artéria coronária descendente anterior. Os infartos, de acordo com a literatura (PFEPFER, 1991), são classificados como moderados. A análise dos resultados mostra que os grupos infartados apresentam área de acinesia importante, sendo esta maior nos tempos de 21 e 42 dias, quando a cicatriz está formada. Por outro lado, o tratamento com piridostigmina melhora esta redução do funcionamento da parede ventricular em todos os tempos.

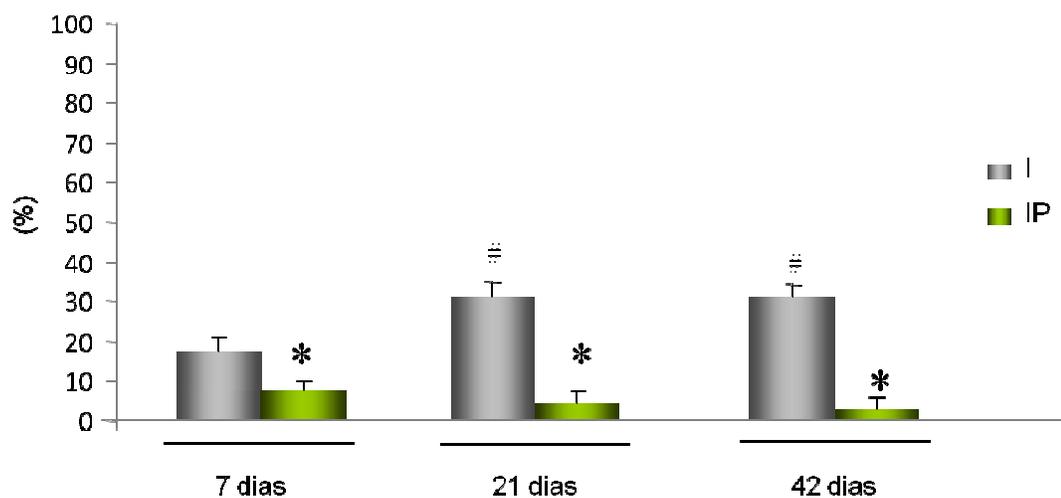


Figura 30 - Valores área de acinesia nos infartados (I), Infartados tratados (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (em %). (* vs C, # vs I7dias, *# p ≤ 0.05 considerado significativo).

Área de Infarto

As medidas da área de infarto foram feitas nos grupos que tiveram ligadura da artéria interventricular anterior (I e IP). Como a medida histológica permite visualizar a cicatriz formada e esta normalmente se estabelece até os 21 dias, serão apresentados a seguir os valores encontrados para os grupos infartados de 21 e 42 dias (figura 31). Os infartos, de acordo com a literatura (PFEPFER, 1991), são classificados como moderados. Como pode ser visto na figura 31, os animais não tratados apresentaram área de infarto entre 25 e 30%, enquanto o tratamento com piridostigmina aboliu a formação de cicatriz.

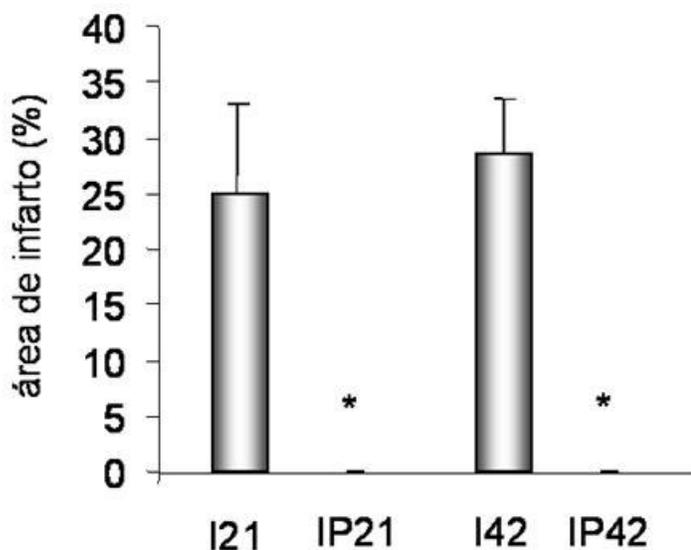


Figura 31 - Valores área de infarto nos infartados (I), Infartados tratados (IP) nos tempos de 21 e 42 dias (em %).

4.2.2.5 Correlação da Pressão Diastólica Final e Fração de Ejeção.

A figura 32 representa a correlação entre a pressão diastólica final e fração de ejeção, considerando todos os grupos estudados (controle, piridostigmina, infartado e infartado piridostigmina). A correlação apresenta-se negativa ($r = -0,65$; $p \leq 0,05$), indicando que quanto maior a PDF menor será a fração de ejeção. Tal resultado corrobora com a idéia de que o aumento de PDF (incapacidade de esvaziar adequadamente o ventrículo e permanência de mais sangue na cavidade durante a diástole) observado após o infarto resulta de uma piora de função sistólica, diretamente relacionada a uma redução na fração de ejeção.

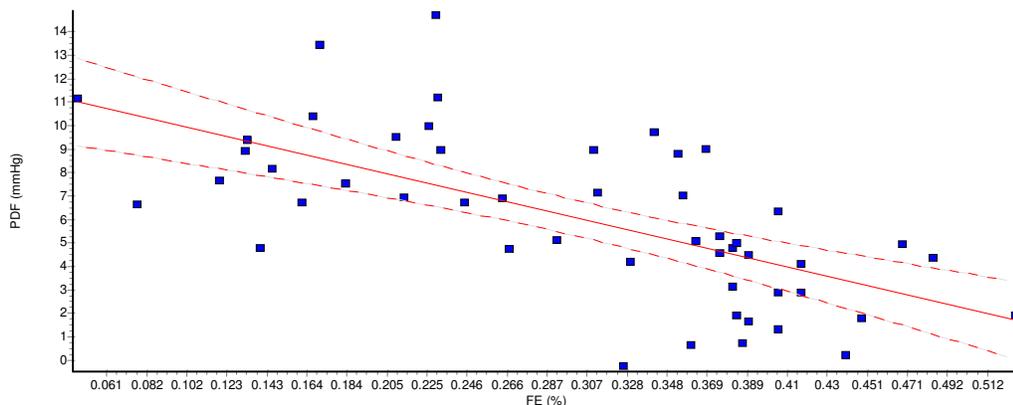


Figura 32 - Correlação dos valores de pressão diastólica final e fração de ejeção nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias.

4.3 Estudo da Função Autonômica

4.3.1 Variáveis Hemodinâmicas no Domínio da Freqüência

Modulação Autonômica

A modulação autonômica é dada pela análise dos dados no domínio da freqüência que avalia, por cálculo matemático, a participação dos sistemas simpático (banda de baixa freqüência) e parassimpático (banda de alta freqüência), como já descrito anteriormente na metodologia.

a) Banda de Baixa Freqüência do Intervalo de Pulso (BF)

Os valores apresentados na figura 33 e tabela 15 (apresentada em anexo) mostram que tanto em 7 quanto em 21 e 42 dias ocorreu uma redução dos valores da banda de baixa freqüência em todos os animais infartados ou não, após o tratamento com piridostigmina.

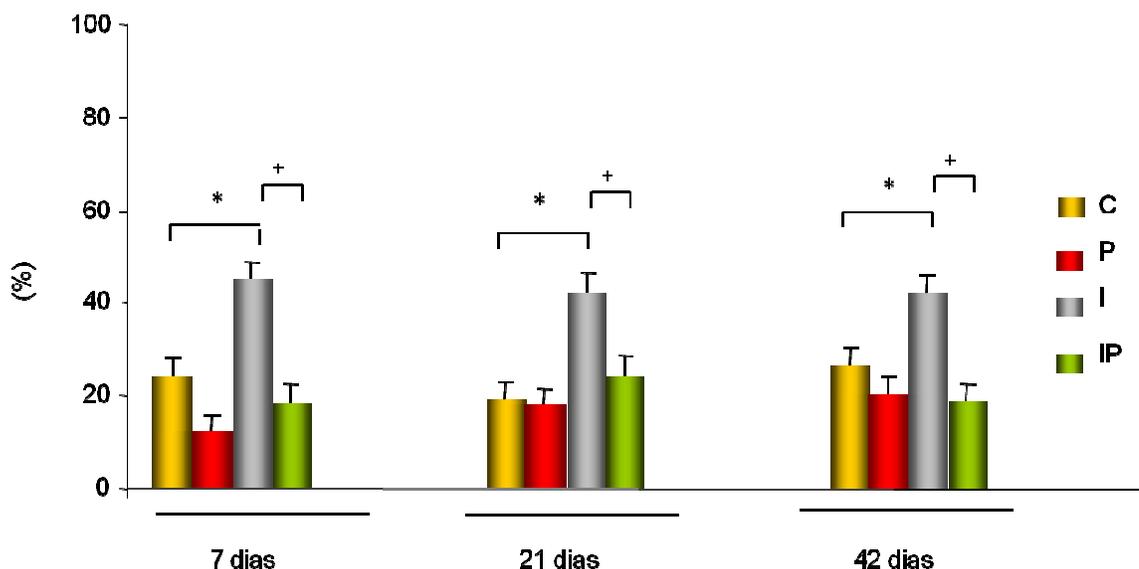


Figura 33 - Valores de BF do intervalo de pulso nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (em %), (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

b) Banda de Alta Frequência do Intervalo de Pulso (AF)

Os valores apresentados na tabela 16 (apresentada em anexo) e figura 34 mostram que ocorreu um aumento dos valores da banda de alta frequência da variabilidade do IP após o tratamento. Por outro lado, em todos os tempos de tratamento não mudou o comportamento do componente AF da variabilidade do IP em todos os grupos.

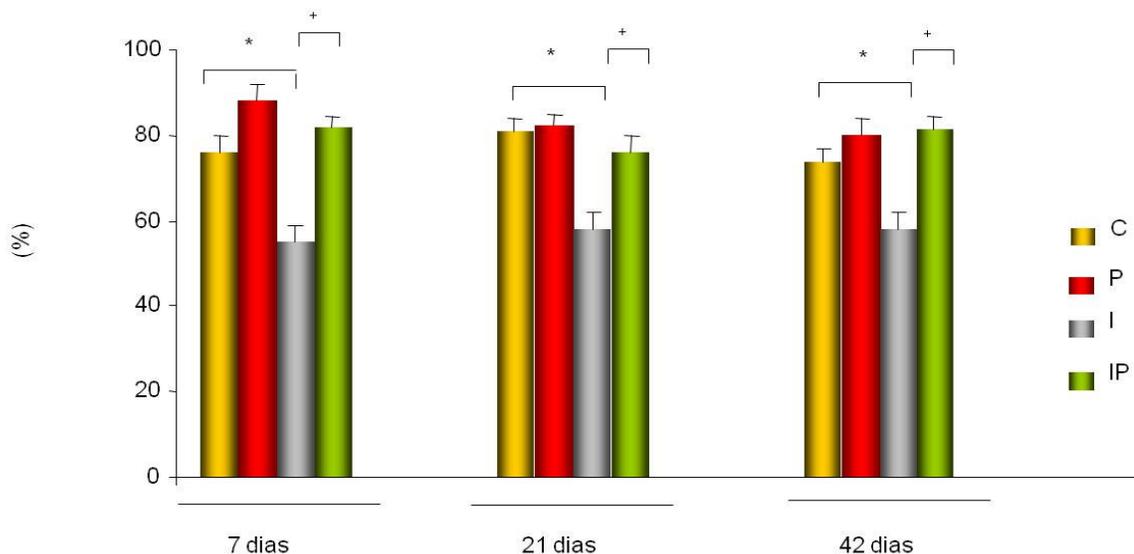


Figura 34 - Valores de AF do intervalo de pulso nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (em %), (* vs C, + vs I, * + $p \leq 0.05$ considerado significativo).

c) Balanço Autonômico

Os valores apresentados na figura 35 e na tabela 17 (apresentada em anexo) ilustram os dados de balanço autonômico cardíaco expresso pela razão BF/AF. Estes sugerem que o tratamento reduz o balanço autonômico em todos os tempos estudados nos grupos controle e infartado.

Desta forma, pode-se considerar que o tratamento com piridostigmina reduz, seja em animais intactos como em infartados, a relação entre atividade simpática e parassimpática, indicando uma melhora de ação parassimpática sobre o coração. Isso corrobora com os resultados

observados nos bloqueios autonômicos, onde se verifica redução do tono simpático e aumento do parassimpático (apresentados a seguir).

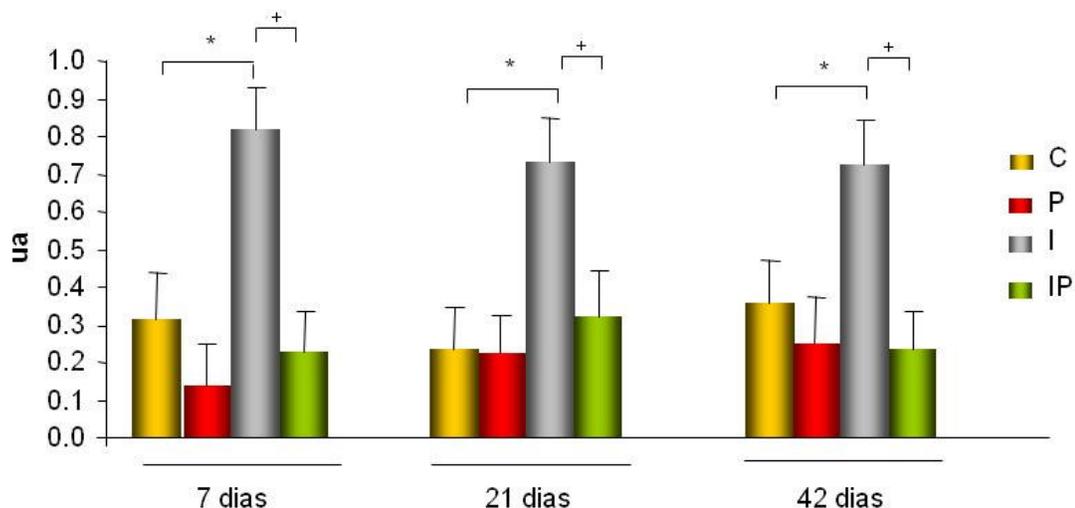


Figura 35 - Valores de balanço autonômico cardíaco Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Variância de Intervalo de Pulso

De acordo com os valores da figura 36 e da tabela 18 (apresentada em anexo), pode-se verificar que a variância da frequência cardíaca dos animais controles aumentou após tratamento com piridostigmina. No infarto, os valores de variabilidade apresentam-se reduzidos em todos os tempos estudados, e aumentam após o tratamento para valores maiores do que os do grupo controle.

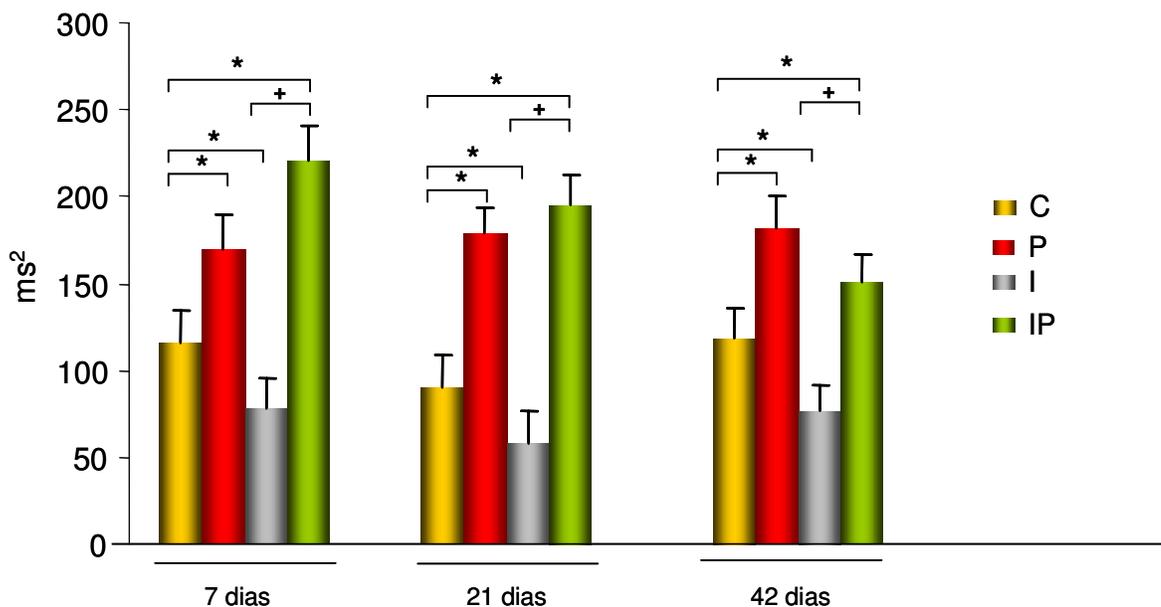


Figura 36 - Valores de variância do intervalo de pulso nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, * + $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Variância de Pressão Arterial Sistólica

De acordo com os valores apresentados na figura 37 e na tabela 19 (apresentada em anexo), abaixo pode-se verificar que a variância de PAS é semelhante entre os grupos.

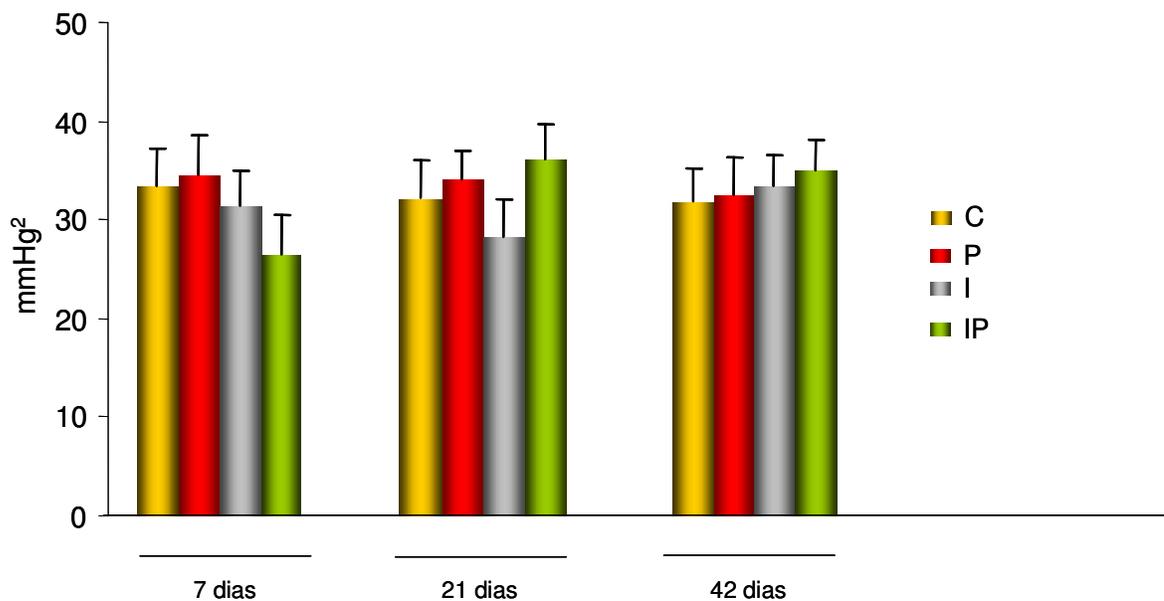


Figura 37 - Valores de variância de PAS nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias.

4.3.2 Sensibilidade Barorreflexa

Os índices de taquicardia e bradicardia reflexa foram comparados separadamente para estudar a sensibilidade do reflexo pressorreceptor. Pode-se observar que, após o tratamento com piridostigmina, ocorre uma melhora da sensibilidade barorreflexa em todos os tempos estudados, corroborando com dados da literatura que descrevem que após 7 dias há esta melhora (SOARES *et al*, 2004). Os resultados do presente estudo mostram que esta resposta é mantida em 21 e 42 dias de tratamento.

A figura 38 (e tabela 20, apresentada em anexo) apresenta os valores obtidos para os índices de taquicardia nos grupos e tempos estudados. O tratamento com piridostigmina aumenta a taquicardia reflexa nos três tempos de estudo. Ainda, observa-se que os animais infartados apresentam uma redução da taquicardia, que após o tratamento com piridostigmina retorna a valores semelhantes aos encontrados em animais controles em todos os tempos estudados.

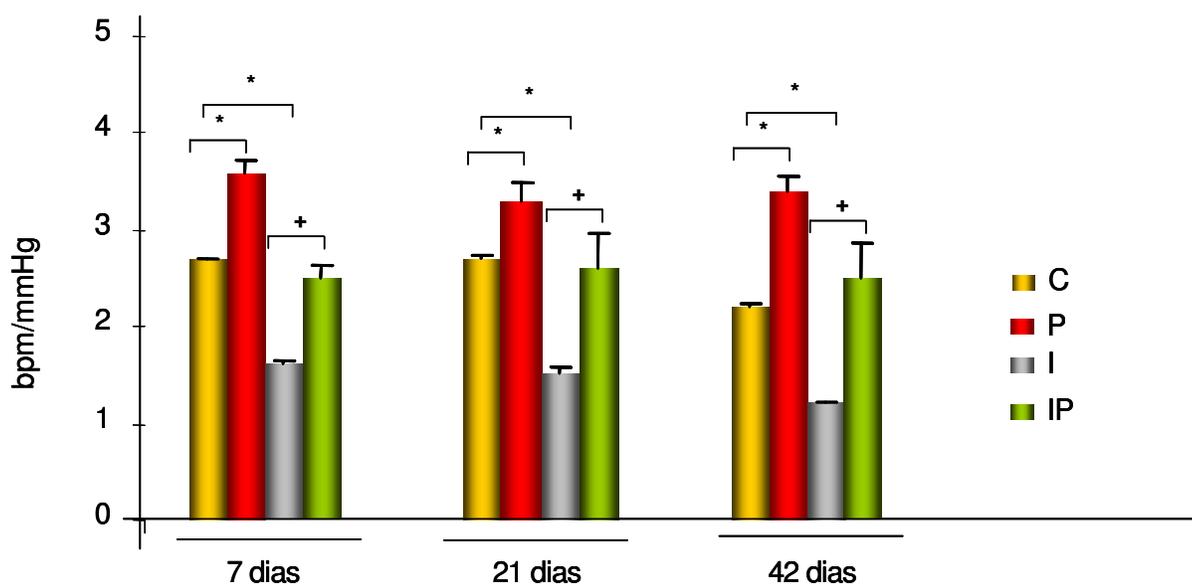


Figura 38 - Valores de taquicardia reflexa nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

A figura 39 (e tabela 21, apresentada em anexo) apresenta os valores obtidos para os índices de bradicardia nos grupos e tempos estudados. Semelhante ao observado para os índices de taquicardia, também ocorre

um aumento da bradicardia reflexa após o tratamento com piridostigmina. Além disso, a redução de bradicardia reflexa nos animais infartos é totalmente abolida se houver tratamento com piridostigmina. Um fato interessante é o de que não só ocorre aumento da bradicardia nos animais IP, como esta está inclusive aumentada em relação aos controles.

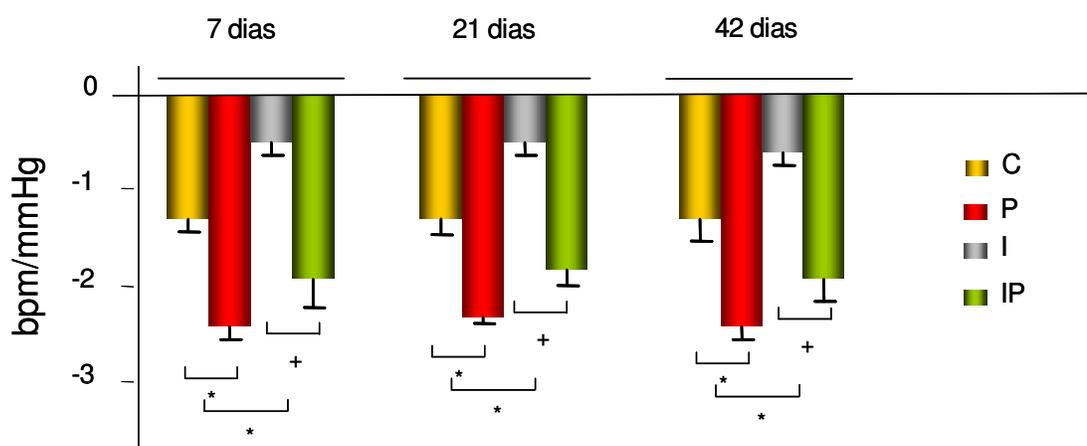


Figura 39 - Valores de bradicardia reflexa nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.3.3 Avaliação do Bloqueio Autonômico

Os dados correspondentes à avaliação do bloqueio autonômico (tônus vagal, tônus simpático e frequência cardíaca intrínseca) estão apresentados na figura 40.

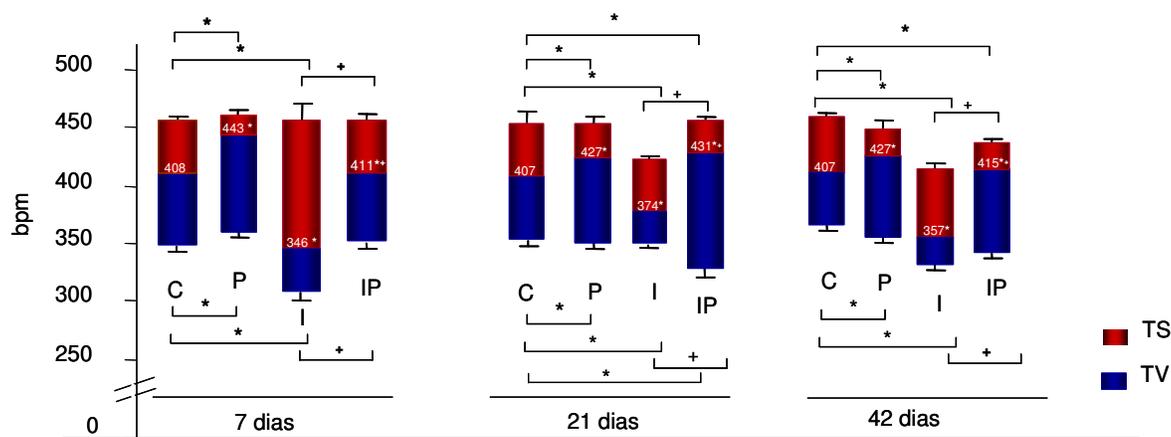


Figura 40 - Valores de TV, TS, FCI nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7, 21 e 42 dias (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

O tratamento com piridostigmina, em todos os tempos estudados, leva ao aumento do tônus vagal em todos os grupos tratados quando comparados a seus controles intactos ou infartados. Já quando administrada após o infarto, esta droga, é capaz de restabelecer o tônus vagal (TV) a valores semelhantes aos encontrados em animais controles, uma vez que animais infartados apresentam uma redução significativa deste parâmetro (tabela 22).

Tabela 22 - Tabela dos valores de Tônus Vagal - TV (em bpm) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	53 ± 4	79 ± 4*	39 ± 16*	62 ± 9 ⁺
21 dias	54 ± 4	72 ± 5*	32 ± 2*	102 ± 7**
42 dias	50 ± 3	74 ± 4*	34 ± 5*	79 ± 6**

(* vs C, ⁺ vs I, p ≤ 0.05 considerado significativo).

O tônus simpático (TS) apresenta-se semelhantemente reduzido após a administração de piridostigmina em todos os tempos e grupos estudados. Nos animais infartados, a participação do simpático está aumentada, sendo maior em 7 do que em 21 e 42 dias (embora esteja semelhantemente aumentado quando comparada aos controles). Contudo, o tratamento com piridostigmina após o infarto, foi capaz de reduzir os valores de tônus simpático àqueles encontrados em animais controles em todos os tempos estudados (7, 21 e 42 dias) (tabela 23).

Tabela 23 - Tabela dos valores de Tônus Simpático - TS (em bpm) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	51 ± 5	20 ± 3*	106 ± 5*	41 ± 4**
21 dias	50 ± 5	30 ± 5*	53 ± 1	28 ± 8**
42 dias	57 ± 4	27 ± 6*	64 ± 5	29 ± 2**

(* vs C, + vs I, p ≤ 0.05 considerado significativo).

Os valores de Frequência Cardíaca Intrínseca (FCI) indicam que o tratamento com piridostigmina não só aumenta os valores de FCI após o tratamento em animais controle tanto em 7, 21 e 42 dias, mas também restaura os valores de FCI em animais infartados (tabela 24). Estes valores assemelham-se àqueles encontrados em animais controles.

Tabela 24 - Tabela dos valores de Frequência Cardíaca Intrínseca - FCI (em bpm) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	408 ± 10	443 ± 3*	346 ± 19*	411 ± 8**
21 dias	407 ± 8	427 ± 5*	374 ± 4 *	431 ± 7**
42 dias	411 ± 7	427 ± 4*	357 ± 8 *	415 ± 4**

(* vs C, + vs I, p ≤ 0.05 considerado significativo).

4.3.4 Estimulação Elétrica do Vago

Grupo de 7 dias

Conforme os dados apresentados na figura 41 e na tabela 25 (apresentada em anexo), todos os animais apresentaram bradicardias maiores conforme era aumentada a freqüência de estimulação. Observa-se redução dessas respostas em animais infartados enquanto a piridostigmina potencializou as respostas de bradicardia tanto em controles quanto em infartados.

Observa-se que na freqüência de estimulação de 16Hz pode haver saturação de resposta (pelo menos nos grupos tratados), visto que a bradicardia não foi diferente.

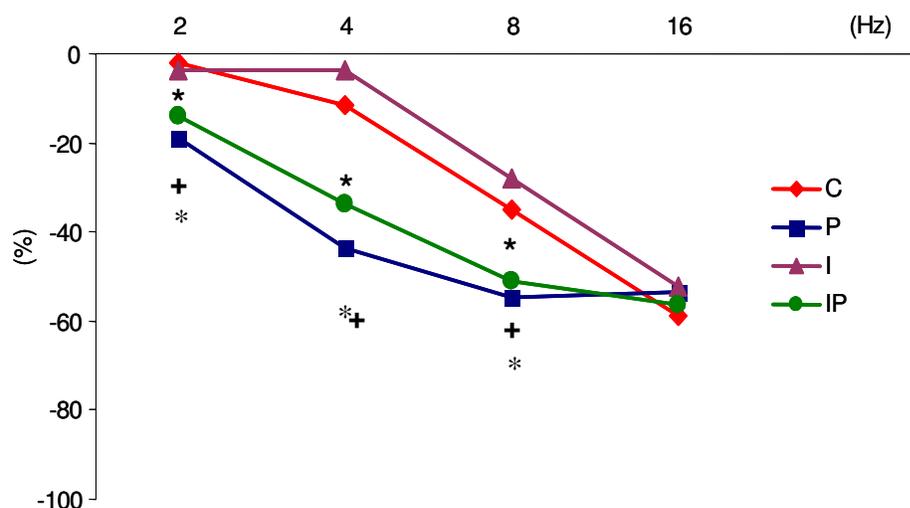


Figura 41 - Valores percentuais de bradicardia após a estimulação elétrica do nervo vago nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) nos tempos de 7 dias. (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Grupo de 21 dias

Conforme os dados apresentados na figura 42 e na tabela 26 (apresentada em anexo), observa-se que todos os grupos controles e infartados possuem valores percentuais de bradicardia progressivamente maiores à medida que aumenta a frequência de estímulo. O tratamento aumentou as respostas bradicárdicas tanto em animais controles quanto em animais infartados.

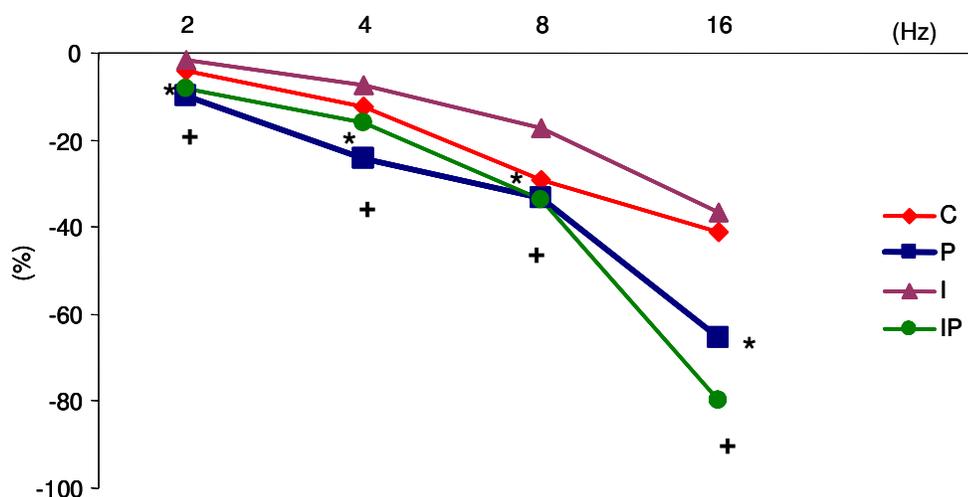


Figura 42 - Valores percentuais de bradicardia após a estimulação elétrica do nervo vago nos Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) no tempo de 21 dias. (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Grupo de 42 dias

Tanto em animais controles quanto em animais infartados há um mesmo padrão de resposta de bradicardia frente ao estímulo elétrico. Somente o grupo tratado parece ser diferente do não tratado (figura 43 e tabela 27, apresentada em anexo) e apenas nas frequências de 8 e 16 Hz.

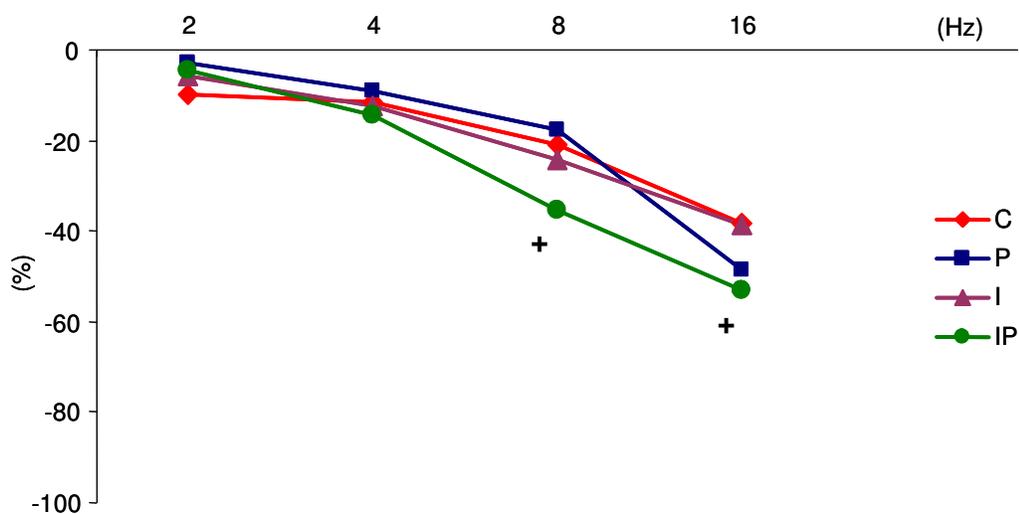


Figura 43 - Valores percentuais de bradicardia após a estimulação elétrica do nervo vago nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) no tempo 42 dias. (+ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

4.3.6 Estimulação Química com Metacolina

Grupo de 7 dias

De acordo com a figura 44 e a tabela 28 (apresentada em anexo), os animais infartados tratados apresentaram uma resposta bradicárdica maior que os animais controles quando administrada a dose de 5 μg de metacolina (dose máxima). Não há diferenças significativas nas outras doses utilizadas e grupos analisados.

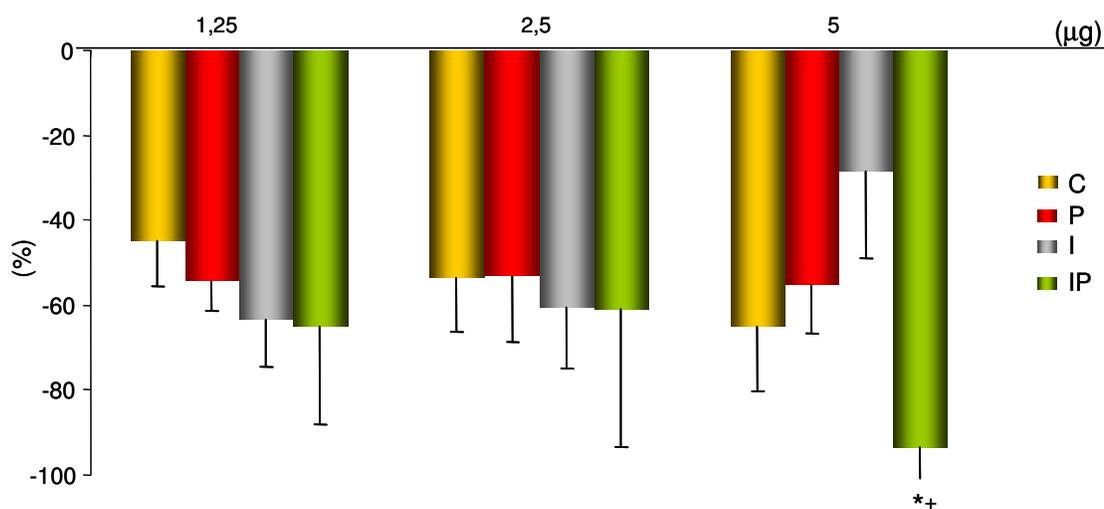


Figura 44 - Valores percentuais de bradicardia após a infusão de metacolina nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) no tempo de 7 dias. (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Grupo de 21 dias

Os dados apresentados na figura 45 e na tabela 29 (apresentada em anexo), mostram que o tratamento com piridostigmina em animais infartados parece potencializar as respostas bradicárdicas nas doses de 1,25 μg , 2,5 μg e 5 μg . Entretanto não há diferenças estatísticas em nenhum dos tempos e grupos.

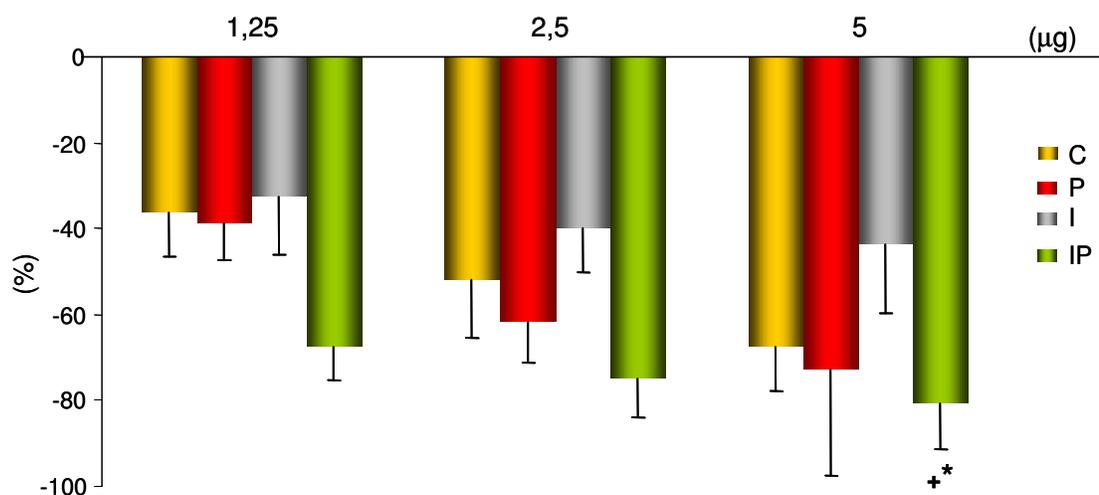


Figura 45 - Figura representativa valores percentuais de bradicardia após a infusão de metacolina nos animais nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) no tempo de 21 dias. (* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Grupo de 42 dias

Considerando todos os tempos de tratamento e grupos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas apenas entre animais infartados tratados, nas as doses de 2,5 e 5 μg como pode ser visto na figura 46 (tabela 30, em anexo). Esses animais apresentaram resposta reduzida em relação a seu controle infartado.

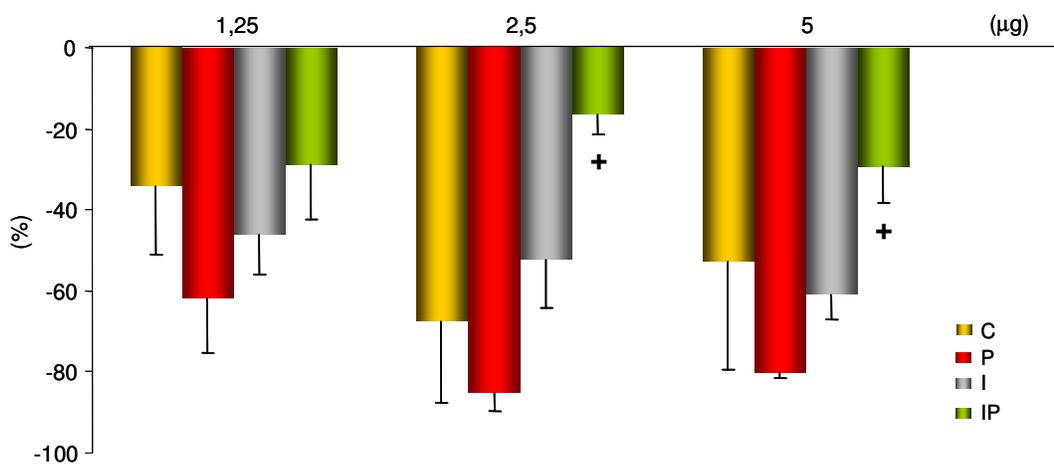


Figura 46 - Valores percentuais de bradicardia após a infusão de metacolina nos animais nos animais Controles (C), Piridostigmina (P), Infartados (I), Infartados Piridostigmina (IP) no tempo de 42 dias (em %). (+ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os resultados deste trabalho mostraram que a inibição crônica da acetilcolinesterase pela administração de brometo de piridostigmina por diferentes tempos após a oclusão coronariana completa, induz:

- 1) Normalização da PA, sem alteração da FC basal, com recuperação da função sistólica medida pelas frações de ejeção e de encurtamento, bem como das dP/dt positiva e negativa; a função diastólica também melhorou conforme se observa pela redução do diâmetro do átrio esquerdo e da PDF, que retornou a valores de normalidade.
- 2) Aumento do tônus vagal e redução do tônus simpático, com melhora da sensibilidade do barorreflexo, aumento da variabilidade da FC e aumento da banda de alta freqüência e redução da banda de baixa freqüência da variabilidade da freqüência cardíaca.
- 3) Todas essas alterações foram acompanhadas de redução da área de acinesia medida pela ecocardiografia e confirmada pela histologia nos diferentes tempos de oclusão coronariana.

ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS E DA FUNÇÃO CARDÍACA NA OCLUSÃO CORONARIANA: EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA

Com relação aos dados hemodinâmicos e em especial à PA, a única alteração observada e que aconteceu em todos os tempos de observação, foi a redução da PAS, PAM e PAD nos animais infartados, conforme já observado em humanos (GRASSI *et al.*, 1992) e em animais de experimentação. Mill *et al.*, (1995) observaram hipotensão em ratos avaliados com 30 dias de IM, sendo esta também observada por Koike *et al.*(1996) com 8 dias pós-IM. No presente trabalho, as avaliações hemodinâmicas realizadas após 7, 21 e 42 dias de IM mostraram redução da PAS e inalteração da FC no grupo I quando comparado ao grupo C. Outros autores observaram previamente, taquicardia e hipotensão nos animais com 1 e 10 dias após IM (MILL *et al.*, 1991; MEYRELLES *et al.*, 1994; LACERDA, 2000), e, também em nosso laboratório, De Angelis *et al.*, 2001 demonstraram reduzida PA e FC em animais com 8 semanas de IM. Por outro lado, existem estudos que mostram que ratos submetidos ao IM, não apresentam hipotensão e bradicardia 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico, mantendo-se em níveis próximos à normalidade (MILL *et al.*, 1997). A FC também não sofreu alteração estatística nos animais infartados (7 dias) em relação aos controles, revertendo possivelmente, o quadro de taquicardia observado em ratos com apenas um dia de IM (LACERDA, 2000). O mesmo trabalho mostrou que a taquicardia pode ser substituída pela bradicardia em 7 dias após o IM. De fato, no presente estudo observamos em 21 e 42 de oclusão

coronariana, redução da FC basal. Essa bradicardia pode representar um mecanismo de ajuste frente ao miocárdio lesado, com redução da demanda metabólica e aumento do tempo de enchimento diastólico, levando à maior distensão do ventrículo esquerdo com conseqüente aumento da força de contração. Essa hipótese pode ser confirmada quando observamos o aumento da PDF nesse grupo em todos os tempos de infarto e a recuperação da contratilidade pelo retorno da dp/dt positiva a valores semelhantes aos do controle nos tempos de 21 e 42 dias de IAM. A redução da PA, que muitas vezes acompanha o infarto agudo do miocárdio, pode ser devida à redução do débito cardíaco por redução do desempenho do coração afetado pela isquemia. De fato, no presente trabalho a avaliação da área de acinesia, bem como a avaliação pela histologia revelou que 25 a 30% do ventrículo esquerdo estava infartado.

O tratamento com piridostigmina normalizou a redução de PA observada após o IAM em todos os tempo estudados. Essa recuperação provavelmente se deva à recuperação da função cardíaca observada pela normalização das frações de ejeção e de encurtamento observada em 21 e 42 dias, pela redução da PDF e melhora da função diastólica e retorno da FC a valores de normalidade nesses tempos. Em 7 dias, somente a dp/dt positiva aumenta após o tratamento com piridostigmina, sugerindo que maiores tempos de tratamento possam influenciar as mudanças mais consistentes na função.

Nos animais controle, a piridostigmina não modificou a PA, mesmo no tratamento mais prolongado, quando houve redução da FC basal. Isso provavelmente se deva a manutenção das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. De fato, resultados anteriores de nosso grupo, porém obtidos durante um tempo menor de acompanhamento (7 dias), não mostraram alterações significativas da PA nem da FC basal em ratos normotensos. (SOARES *et al*, 2004).

Sabe-se que a estimulação muscarínica cardíaca por inibição da acetilcolinesterase, permite o aumento da concentração sináptica do neurotransmissor, promovendo assim um efeito parassimpaticomimético (STEPHENSON e KOLKA, 1990). A piridostigmina, um carbamato, é um agente anticolinesterásico reversível, com uma meia-vida de aproximadamente 2,5h (KOLKA e STEPHENSON, 1990). Tanto a piridostigmina como outros anticolinesterásicos exercem suas ações em sinapses colinérgicas, onde a acetilcolina, liberada sob estimulação neural não é hidrolizada e continua ligada com os receptores disponíveis na fenda sináptica. Por ter uma amina quaternária, a piridostigmina tem uma ação de caráter periférico, pois não atravessa a barreira hemato-encefálica.

Quanto à função cardíaca, foi possível observar que a oclusão da artéria coronária induziu alterações das funções sistólica e diastólica que, avaliadas pelo ecocardiograma, se caracterizaram por redução da fração de ejeção e de encurtamento, redução do tempo de desaceleração da onda E e aumento do

átrio esquerdo. As imagens ultra-sonográficas das estruturas cardíacas e velocidade do fluxo sanguíneo pelo ecodopplercardiograma são largamente reconhecidas por proporcionar algumas das mais acuradas medidas não invasivas para caracterização da morfometria ventricular e análise das funções sistólica e diastólica em humanos (DEVEREUX *et al.*, 1987; DEVEREUX *et al.*, 1986; DEVEREUX & REICHEK, 1977).

Em animais de experimentação, o uso do ecocardiograma como metodologia não invasiva da análise da função e estrutura cardíacas, também vem se tornando rotina graças ao avanço tecnológico e desenvolvimento de transdutores ultra-sonográficos com freqüências maiores, que proporcionam uma resolução adequada a pequenas estruturas (PAWLUSH *et al.*, 1993). Essa prática vem sendo amplamente utilizada em estudos que requeiram análise anátomo-funcional do sistema cardiovascular no curso temporal de determinada patologia, exatamente por permitir a sobrevivência do animal até o final do experimento. Moléstias como infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, entre outras, com tratamento associado ou não, podem ser avaliados ao longo de períodos pré-estabelecidos através desta técnica. No presente estudo, buscamos a avaliação da morfometria cardíaca pelo ecocardiograma, bem como a avaliação das alterações funcionais do VE por este reconhecido método não invasivo e pela medida invasiva da pressão intra-ventricular. Cabe salientar que foi somente pelo uso desse recurso que foi possível incluir no presente estudo o grupo de animais infartados e acompanhá-

los nos diferentes tempos de tratamento, mesmo que tenhamos usado a área de acinesia como índice de lesão isquêmica.

A indução do infarto do miocárdio (IM) experimental, por ligadura coronariana, foi utilizada no presente estudo, pois está bem estabelecido na literatura que este procedimento provoca isquemia miocárdica e inicia um processo de disfunção e remodelamento do VE, além de induzir a formação de vasos colaterais no coração (PFFEFER *et al.*, 1991; BANAI *et al.*, 1994ab; ELSNER & RIEGGER, 1995; UNGER *et al.*, 2001). Devido a sua relevância clínica e uma relativa facilidade metodológica, a insuficiência cardíaca induzida pelo IM é um dos modelos mais utilizados nos trabalhos com animais de pequeno porte (ELSER *et al.* 1995). Entretanto, as desvantagens de utilizar esse procedimento experimental incluem a necessidade de toracotomia, uma mortalidade relativamente alta durante o procedimento cirúrgico e nas primeiras horas pós-IM (~ 30% neste estudo), e a indução, em muitos casos, de uma IC moderada.

Na literatura, o IM é caracterizado de acordo com seu tamanho: inferiores a 20% do VE – pequenos; de 20-39% - moderados; maiores que 40% - grandes (PFEFFER *et al.*, 1985ab, PFEFFER *et al.*, 1991). No presente estudo a área do infarto, avaliada pelo ecocardiograma, foi em torno de 25 a 30% da parede do VE na avaliação inicial nos grupos infartados (I e IP).

Como já citado anteriormente, a ligadura da coronária em ratos causa uma perda em torno de 40% da massa de miócitos do ventrículo esquerdo (ANVERSA *et al.*, 1985a, PFEFFER *et al.*, 1991, STEFANON *et al.*, 1994) sendo responsável pela hipotensão, redução da fração de ejeção e do débito cardíaco após o IM (DE ANGELIS *et al.*, 2001).

Apesar da hipertrofia cardíaca compensar o déficit provocado pela morte dos miócitos decorrente do IM na fase inicial deste processo (aproximadamente até duas semanas pós-infarto), cronicamente a hipertrofia ventricular esquerda não resulta em melhora da função sistólica do VE, avaliada em corações isolados por Mill *et al.* (1990) e pelo método de angiografia direta (para avaliar a função do VE em ratos anestesiados) por Liu *et al.* (1997). Todavia, a função do ventrículo infartado não depende só do tamanho e da localização do IM (CORR *et al.*, 1976; MATHEY *et al.*, 1974), mas também das alterações envolvidas na complacência ventricular, influências neurohumorais, resistência vascular sistêmica e complacência venosa, além da progressão e extensão da hipertrofia no miocárdio não infartado (PFEFFER *et al.*, 1979).

No presente estudo, a função sistólica mostrou-se reduzida nos animais infartados (I e IP) quando comparados aos animais não infartados (C e P). Nas avaliações ecocardiográficas, foi observada redução da FE nos grupos infartados em relação aos grupos não infartados (C e P). Os valores de FE (30-50%) observados nos grupos infartados podem indicar um déficit moderado do VE, conforme Campos Filho *et al.* (2005). Além disso, é importante lembrar que

todos os pacientes portadores de FE inferior a 50% são considerados portadores de disfunção sistólica (SIMÕES *et al.*, 2005). Indivíduos nestas condições apresentam grande predisposição para evolução ao quadro de insuficiência cardíaca (IC), sendo esta uma síndrome clínica de alta incidência, caracterizada por intolerância ao esforço físico, fadiga associada ou não a edema e dispnéia (ROVEDA *et al.*, 2005).

As avaliações diretas da função sistólica ventricular confirmam as evidências ecocardiográficas através da demonstração da reduzida $+dP/dt$ nos grupos infartados em relação ao controle. Uma vez que detectamos comportamentos semelhantes de disfunção sistólica nas avaliações não invasivas (ecocardiograma) e invasivas (canulação do VE) nos grupos estudados, resolvemos, então, testar o grau de correlação entre estes dois métodos. Conforme pode ser observado encontramos uma correlação positiva ($r=0,65$ $p<0,005$) entre a PDF e a fração de ejeção (FE) nos grupos avaliados.

A avaliação do tempo de desaceleração da onda E e o tamanho do átrio esquerdo mostrou-se alterada nos grupos infartados, com redução do primeiro e aumento do segundo, refletindo um estado de disfunção diastólica. Evidências obtidas de estudo ecocardiográfico em 571 pacientes após o IAM, mostraram que aqueles indivíduos que apresentam um padrão restitutivo precocemente durante sua evolução temporal, expresso por um tempo reduzido de desaceleração do pico E, são fortes candidatos à disfunção cardíaca associada à progressiva dilatação do VE (TEMPORELLI *et al.*, 2003). Os mesmos autores reforçam a importância da disfunção diastólica como preditor do risco de

progressão para a dilatação do VE, mesmo em presença de um IAM não complicado.

Outra variável que estava alterada nos animais infartados nesse estudo, e que tem sido utilizada como marcador da disfunção diastólica, é o aumento do tamanho do átrio esquerdo. Dados recentes obtidos em um grupo de 2705 pacientes submetidos ao ecocardiograma de estresse mostraram que o tamanho do átrio esquerdo foi capaz de adicionalmente estratificar risco em grupos com eco de estresse normal e anormal (BANGALORE *et al*, 2007).

O presente estudo foi capaz de mostrar que as alterações da função cardíaca induzidas pelo IAM foram em grande parte prevenidas pela estimulação colinérgica crônica por piridostigmina. De fato, se observarmos os indicadores de função sistólica e diastólica avaliados pelo ecocardiograma, veremos que a piridostigmina administrada por 21 e 42 dias, aumenta as frações de ejeção e de encurtamento, o tempo de desaceleração da onda E e reduz o tamanho do átrio esquerdo. As medidas diretas de função do VE, como a PDF e as derivadas de contração e relaxamento estavam também melhoradas pela piridostigmina. Em sete dias de tratamento e de IAM, nem as frações de ejeção e encurtamento melhoram, mas não se observa alteração do tempo de desaceleração da onda E. Por outro lado, o tamanho do átrio esquerdo, aumentado no grupo infartado, volta a valores semelhantes aos observados nos controles. Tais achados foram confirmados pelas medidas diretas da função do VE, visto que a PDF se manteve aumentada após o tratamento e a dP/dt negativa, reduzida em 7 dias. Somente a dP/dt positiva

estava aumentada, o que poderia em parte ser explicado pelo aumento da PDF, levando à distensão da cavidade do VE e aumentando a força de contração.

A estimulação colinérgica é uma intervenção conhecida por liberar óxido nítrico pelo endotélio (FURCHGOTT *et al*, 1980), sendo esta uma das possibilidades para explicar a melhora da função diastólica observada em 21 e 42 dias de tratamento com piridostigmina, uma vez que já foi demonstrado que o óxido nítrico aumenta a distensibilidade ventricular em humanos (PAULUS *et al*, 1999). Em relação à melhora da função sistólica e à manutenção da PA após tratamento com piridostigmina, uma questão que deve ser considerada é o fato de que os inibidores da colinesterase aumentam a disponibilidade de acetilcolina, inibindo sua hidrólise nos gânglios autonômicos, incluindo os ramos adrenérgicos. É portanto presumível que a piridostigmina aumente a transmissão ganglionar simpática levando a um aumento do tônus adrenérgico. Este é o possível mecanismo de ação desta droga na prevenção da queda da PA na hipotensão ortostática.(SINGER *et al.*, 2006). Recentemente, a estimulação vagal na melhora da função hemodinâmica na insuficiência cardíaca tem sido atribuída, prioritariamente, à redução da FC (SABBAH *et al*, 2007). No presente estudo, entretanto, não houve variação da FC basal após tratamento com piridostigmina nos animais infartados. Mesmo nos animais tratados com piridostigmina por 42 dias, a FC basal caiu, não se observou alteração significativa da função. Independente se direta ou indireta (via administração de anticolinesterásicos, por exemplo), a estimulação do vago parece ter efeitos benéficos no remodelamento e no prognóstico clínico da

insuficiência cardíaca, sugerindo uma relação estreita entre disfunção cardíaca e desregulação autonômica.

ALTERAÇÕES DA FUNÇÃO AUTONÔMICA NA OCLUSÃO CORONARIANA: EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA

Nas últimas décadas, assistimos a um grande progresso no tratamento da insuficiência coronária, particularmente atribuído à evolução do arsenal terapêutico. Os beta-bloqueadores, por exemplo, têm demonstrado promover em alguns estudos, redução significativa da mortalidade, principalmente através de redução da morte súbita (GHEORGHIADÉ *et al.*, 1993; Kostis JB *et al.*, 1987),. Estes efeitos se devem à diminuição de consumo miocárdico de O₂ e, adicionalmente, ao bloqueio da hiperatividade adrenérgica pós-infarto (WEBB *et al.* 1972). Recentemente, tem-se procurado separar subgrupos com risco maior de morte súbita, utilizando diferentes medidas como a eletrocardiografia de alta resolução, a monitoração eletrocardiográfica contínua e análise da sensibilidade do barorreflexo. Evidenciou-se que a disautonomia por hiperatividade adrenérgica, poderia estar acompanhada de hipoatividade vagal, expressa por redução da variabilidade do intervalo RR e da sensibilidade do barorreflexo (MOSER *et al.*, 1994). A partir de sua associação com morte súbita (WOLF *et al.*, 1978) e da publicação de evidências experimentais (BILLMAN *et al.*, 1982) e clínicas (KEIGER *et al.*, 1984) do seu valor prognóstico, a hipoatividade vagal passou a ser considerada um fator de risco independente

para morte súbita no período pós-infarto (LEVY *et al*, 1994). Surgiu portanto, a busca por drogas que modulassem o sistema parassimpático, particularmente atuando sobre a ação da acetilcolina (ACh). A partir daí, se identificam alguns trabalhos na literatura (CASADEI *et al* 1993; DE FERRARI *et al*, 1993; PEDRETTI *et al.*, 1993; VYBIRAL *et al.*, 1993) com os primeiros dados sobre os efeitos da escopolamina, um agente colinomimético, no tônus vagal de pacientes pós-infarto. Os resultados mostraram efeito vagomimético, com redução da frequência cardíaca e aumento da variabilidade do intervalo RR e/ou da sensibilidade do barorreflexo. Apesar disso, a escopolamina apresentou o inconveniente de somente possuir ação agonista colinérgica em baixas doses, passando a um efeito inverso (bloqueador) em doses maiores (PONTES *et al* , 1999). Nesse sentido, a piridostigmina parece ser uma droga mais adequada, por ser inibidora reversível da acetilcolinesterase (atropina) e já ter sido usada no tratamento da *miastenia gravis*.

No presente estudo, utilizou-se a administração de piridostigmina na água de beber, uma vez que o consumo médio de água foi semelhante nos animais tratados ou não. Uma dose média de 40 mg/kd/dia foi dessa forma administrada aos animais tratados. Tal dose é semelhante à utilizada previamente por nosso grupo e que mostrou efeitos inibitórios sobre a atividade da acetilcolinesterase (SOARES *et al*, 2004).

O tratamento com piridostigmina mostrou-se eficaz em aumentar o tônus vagal, quantificado pelo bloqueio farmacológico por atropina e propranolol e

reduzir o tônus simpático em animais controles e infartados. Além disso, induziu aumento das respostas bradicárdicas e taquicárdicas às variações da PA em todos os tratados, infartados ou não, aumentando significativamente a variabilidade do intervalo de pulso nesses grupos. Somente nos infartados tratados observou-se aumento do componente de alta frequência do IP e redução do de baixa frequência, com concomitante redução do balanço simpátovagal nesses animais.

O controle barorreflexo da circulação é um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da pressão arterial. De fato, o controle da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca pelo barorreflexo é a chave para a homeostase fisiológica. Isso é demonstrado clinicamente em estudos que mostraram que o prejuízo da função barorreflexa é um fator de risco independente para morte súbita em pacientes pós-infarto do miocárdio (LA ROVERE *et al.*, 1998).

O prejuízo da habilidade para adequadamente regular a FC durante mudanças na PA tem sido atribuído a algumas alterações na atividade cardíaca parassimpática (RONDON *et al.*, 2006); entretanto, mudanças na função dos receptores atriais muscarínicos (CARRIER *et al.*, 1987) ou na mediação central do reflexo barorreceptor observadas em outras situações de disfunção parassimpática, não podem ser excluídas (FAZAN *et al.*, 1995).

Assim como a atenuação do controle parassimpático tem sido valorizada como marcador funcional na isquemia miocárdica, a ativação simpática

periférica como resultado da atenuação do barorreflexo, tem também sido repetidamente documentada, especialmente na insuficiência cardíaca.

Em um estudo acompanhando pacientes após infarto do miocárdio, a descarga simpática estava aumentada em poucos dias após o evento isquêmico (2-4 dias) e mantida elevada após 3 a 6 meses (GRAHAM *et al.*, 2002). Além do mais, a insuficiência cardíaca induzida em ratos foi caracterizada por um aumento em diversos fatores como atividade de renina plasmática, arginina vasopressina e fator natriurético atrial na fase aguda e na fase crônica, quando os autores observaram aumento da atividade nervosa simpática (FRANCIS *et al.*, 2001). A hiperatividade simpática, além de estar ligada à morbidade e mortalidade (FRANCIS *et al.*, 1989), também pode contribuir para o agravamento da disfunção barorreflexa em indivíduos com insuficiência cardíaca (ECKBERG *et al.*, 1971).

De fato, nos animais do grupo I também observamos diminuição das respostas bradicárdica e taquicárdica, mesmo em presença de redução da PA em relação ao grupo C, que foram revertidas nos animais tratados com piridostigmina (IP), levando ao retorno a valores similares aos do grupo controle, mas maiores em relação ao grupo I. Lacerda *et al.* (2000) não observaram diferença para os índices de bradicardia e taquicardia reflexa em ratos após 1 e 10 dias de IM quando, comparados ao grupo controle. Porém, Kruger *et al.* (1997) relataram diferenças na bradicardia reflexa em 3 e 28 dias após o IM quando comparados com os grupos controles.

A redução da sensibilidade barorreflexa encontrada nos animais infartados pode, portanto, ser associada às alterações do sistema nervoso autônomo (redução da atividade parassimpática e aumento da atividade simpática), comumente observada nos modelos crônicos de insuficiência cardíaca. Cabe ressaltar que, em um estudo com ratos infartados, a simpatectomia crônica foi eficaz em prevenir a disfunção barorreflexa nestes animais (MIRCOLI *et al.*, 2002).

Dessa forma, intervenções no sentido de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e/ou a participação do parassimpático cardíaco bem como de inibir a atividade simpática no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca têm sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares e poderiam representar um avanço no conhecimento e na terapêutica de pacientes infartados.

Nesse sentido, a inibição dos efeitos da hiperatividade simpática pelo uso de beta-bloqueadores na insuficiência cardíaca tem sido demonstrada ser um meio efetivo de reduzir a mortalidade (YUSUF *et al.*, 1996). Em relação à estimulação colinérgica por drogas parassimpaticomiméticas, não existem informações sobre mortalidade, mas já se tem um considerável número de evidências em favor da melhora autonômica. A estimulação colinérgica protegeu contra a arritmia ventricular em modelos experimentais (STRAMBABADIALE *et al.*, 1991) e interrompeu a taquicardia ventricular em humanos (WAXMAN & WALD, 1977). Além disso, a estimulação colinérgica por

piridostigmina aumentou a variabilidade da FC (NOBREGA *et al*, 2001) e bloqueou as respostas hemodinâmicas (NOBREGA *et al*, 1999) e cardíacas (SANT'ANNA *et al*, 2003) ao estresse mental em humanos saudáveis. Além disso, a piridostigmina aumentou a variabilidade da FC e diminuiu as arritmias ventriculares em pacientes com insuficiência cardíaca (BEHLIN *et al*, 2003)

Neste estudo, a piridostigmina melhorou a variabilidade do intervalo de pulso, embora não tenha modificado a variabilidade da PA, que, todavia, não estava alterada nos grupos infartados. O aumento da variabilidade do intervalo de pulso foi acompanhado do aumento da banda de alta frequência e da redução da de baixa frequência, conforme relatado anteriormente. Isso levou a uma redução do balanço simpátovagal. Essas alterações foram provavelmente devidas ao aumento do tônus vagal e da redução do simpático, conforme avaliado pelo duplo bloqueio farmacológico sobre a resposta de FC. Como a piridostigmina não atravessa a barreira sangue-cérebro, tais efeitos devem estar associados ao aumento de sua disponibilidade na fenda sináptica e, portanto, sujeitos às adaptações esperadas nos receptores periféricos quando expostos a maiores concentrações de seus agonistas. Dessa forma, o tratamento com piridostigmina por diferentes tempos poderia ter resultados em diferentes efeitos sobre a bradicardia dependentes de uma estimulação mais ou menos prolongada (7, 21 e 42 dias). O estudo da via eferente parassimpática pela estimulação elétrica mostrou que, em todos os tempos, os grupos infartados tratados aumentaram a bradicardia quando comparados aos infartados não tratados, embora aos 42 dias isso somente ocorresse nas

freqüências maiores de estimulação. Nos controles, a piridostigmina aumentou a bradicardia em 7 e 21 dias e não foi diferente aos 42 dias de tratamento. As maiores bradicardias absolutas foram encontradas em 16 Hz de estimulação aos 21 dias de tratamento, sugerindo uma variação temporal com atenuação das respostas aos 42 dias. O uso da metacolina para testar a função muscarínica, não mostrou diferenças nos controles nos diferentes tempos, o que se atribui à grande variabilidade nas respostas individuais. Nos infartados tratados, entretanto, foi possível observar na maior dose, redução da bradicardia, sugerindo redução do número de receptores muscarínicos. Quando o vago foi estimulado nesse grupo a bradicardia ocorreu e foi significativamente maior que a do grupo sem tratamento, mostrando respostas muito próximas às do controle normal. É possível, portanto que o tempo maior de tratamento tenha induzido algum tipo de ajuste, provavelmente central, em face da redução da função muscarínica periférica. Como o tônus vagal medido nesse tempo e nesse grupo ainda estava aumentado, é possível que tenha ocorrido aumento central ou ainda ajuste periférico do simpático, de forma que no balanço houvesse um desvio em favor da atividade parassimpática nesse grupo.

Ajustes entre a atividade do nervo e os receptores ao agonista liberado têm sido utilizados para a busca do entendimento de processos fisiopatológicos. Um estudo do nosso laboratório demonstrou que não é o ramo eferente do reflexo comandado pelos pressorreceptores o principal responsável pela disfunção barorreflexa observada no diabetes por STZ em curto prazo (10-20 dias), já que observamos que as respostas reflexas reduzidas dos diabéticos

são acompanhadas de respostas bradicárdicas maiores à estimulação direta do nervo vago e a injeções de metacolina em ratos (DALL'AGO *et al.*, 2002). O aumento da bradicardia induzido pela injeção de metacolina poderia representar hipersensibilidade de receptores muscarínicos caracteristicamente observada em presença de redução da atividade parassimpática, como demonstrada em ratos diabéticos (STZ). Isso indicaria, portanto, que o sistema nervoso central deve ser o sítio da alteração no barorreflexo, uma vez que, não se observaram alterações funcionais de aferência desses barorreceptores em ratos diabéticos por STZ (DALL'AGO *et al.* 2002).

A relação entre inibição da acetilcolinesterase e seus efeitos cardiovasculares é complexa. Em gatos (STEIN *et al.*, 1997), a bradicardia provocada por infusões cumulativas de piridostigmina ocorreu somente após a inibição da acetilcolinesterase ter atingido um estado de saturação. Portanto, somente após doses que não mais produziram inibição da enzima observou-se a bradicardia máxima. Estes autores mostraram também, que a ação bradicárdica deste anticolinesterásico é mais sensível ao bloqueio dos receptores M2 e não é diretamente proporcional ao grau de inibição da colinesterase. No presente estudo, utilizamos doses que sabidamente inibem a atividade da colinesterase (DE LA FUENTE, 2003)

Os efeitos conhecidos do sistema nervoso parassimpático sobre a função cardíaca, FC e condução no nodo atrioventricular parecem ser modulados via receptores M2. Os receptores M3 e M4 podem estar co-localizados em várias estruturas cardíacas, embora seu papel em modular respostas fisiológicas seja

ainda incerto. Os diferentes subtipos de receptores podem ter diferentes efeitos. Os M2 marcadamente reduzem a FC, encurtam os potenciais de ação atriais, aumentam a contração do músculo liso e podem diminuir a contratilidade diretamente. Anticorpos contra os receptores M2 têm sido identificados em pacientes com cardiomiopatia dilatada (ZHANG *et al*, 2002).

Na insuficiência cardíaca, a transmissão vagal ao nível ganglionar está reduzida, a densidade e a composição dos receptores muscarínicos está alterada e a atividade da acetilcolinesterase está diminuída. O bloqueio dos receptores muscarínicos aumenta a liberação de noradrenalina cardíaca na ausência de insuficiência cardíaca, mas essa influência do parassimpático sobre a atividade simpática desaparece na presença da insuficiência cardíaca (AZEVEDO *et al*, 1999). Parece, entretanto, que a redução do controle vagal sobre a FC na insuficiência cardíaca é devida mais a mecanismos pré-sinápticos alterados, possivelmente envolvendo uma função anormal no gânglio.

Até o momento, não são encontrados na literatura trabalhos que demonstrem que os anticolinesterásicos possam melhorar o controle autonômico cardiovascular em indivíduos infartados. O presente estudo parece ser o primeiro a demonstrar que a administração crônica de brometo de piridostigmina aumenta a sensibilidade do barorreflexo em ratos infartados, de maneira semelhante ao que já demonstramos previamente em ratos normais (SOARES *et al*, 2004). Este é um importante marcador autonômico com grande

impacto na estratificação de risco cardiovascular. Existe, portanto, potencial de aplicabilidade clínica do uso da estimulação colinérgica como uma estratégia farmacológica promovendo proteção cardiovascular frente a eventos cardiovasculares associados à disfunção autonômica.

CONSIDERAÇÕES

6 Considerações

Como já repetidamente discutido e mostrado na seção DISCUSSÃO, os resultados obtidos no presente estudo mostram as repercussões do infarto do miocárdio sobre a modulação autonômica periférica cardíaca, e trazem à tona um importante mecanismo de ajuste cardiovascular, que potencialmente pode representar grandes benefícios a indivíduos infartados.

Este mecanismo é relativo ao aumento da disponibilidade de acetilcolina periféricamente, obtido pelo bloqueio da acetilcolinesterase com brometo de piridostigmina.

As repercussões do infarto sobre o sistema cardiovascular confirmaram alterações já descritas, como a redução do tônus parassimpático e o aumento do tônus simpático. Dessa forma, e reconhecendo a importância da manutenção de uma maior variabilidade de frequência cardíaca (VFC) nestes indivíduos, visto que está bem estabelecida a relação entre a redução da VFC e a maior mortalidade nestes pacientes, realizamos o estudo de VFC e do balanço autonômico, bem como a avaliação da resposta local, mediada pela via eferente através da estimulação no nervo vago e da estimulação direta de receptores muscarínicos através de infusões de metacolina. Estes métodos, aliados à combinação de diferentes tempos de tratamento, nos permitiram identificar efeitos semelhantes após 21 e 42 dias de tratamento, provavelmente com ajuste regulatórios diferentes.

Neste sentido, destaca-se a ação da piridostigmina revertendo tanto o aumento do tônus simpático como a redução do tônus vagal nos animais infartados. A estimulação direta do vago e a resposta à metacolina mostraram que essa ação facilitatória da piridostigmina sobre o parassimpático ocorreu provavelmente por ação dos receptores muscarínicos, que provavelmente responderam mais por maior disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica, pelo menos no período de 7 e 21 dias. Esta ação repercutiu sobre a VFC e a sensibilidade do barorreflexo, aumentando-as e potencialmente melhorando o prognóstico. Como isso ocorreu em todos os três tempos de tratamento e em 42 dias a resposta à metacolina estava reduzida nos animais infartados tratados, é possível que outros mecanismos compensatórios incluindo uma adaptação central do tônus parassimpático possam estar ocorrendo. Ressalte-se também que a maior resposta de bradicardia à estimulação do vago ocorreu em 21 dias de tratamento. Já a melhora das funções sistólica e diastólica através da medida de índices diretos e indiretos, permitiu dizer que o tratamento mais longo entre 21 e 42 dias foi mais eficiente em prevenir as alterações funcionais, visto que em 7 dias, só detectamos aumento da dP/dt positiva, enquanto os demais índices funcionais permaneceram deficitários.

A preservação da função cardíaca após a oclusão da artéria coronária em ratos tratados com brometo da piridostigmina deve-se em grande parte à redução da área de acinesia, que regrediu de 25 a 30% nos infartados para valores menores do que 5% nos infartados tratados. Esses dados foram

confirmados pela análise histológica. De que forma a estimulação colinérgica induz todas essas adaptações benéficas após a oclusão coronariana permanece não bem respondido, mas o possível envolvimento do óxido nítrico e da inibição da resposta inflamatória associadas ao aumento da atividade vagal, podem ser alternativas viáveis. A quantificação dos receptores muscarínicos no átrio pode também esclarecer nas diferenças observadas nos diferentes tempos de tratamento.

De qualquer forma, a inibição da acetilcolinesterase periférica, com todos os efeitos observados, pode representar uma nova perspectiva terapêutica no manejo do infarto do miocárdio.

CONCLUSÃO

7 Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e os resultados obtidos, podemos concluir que:

A inibição crônica da acetilcolinesterase pela administração do brometo de piridostigmina em ratos submetidos a oclusão coronariana aboliu as disfunções sistólica e diastólica características do infarto, provavelmente por estimular a função parassimpática, diminuindo o balanço autonômico e reduzindo a área de lesão miocárdica. Esses achados foram mais evidentes em tratamento entre 21 e 42 dias.

A inibição crônica da acetilcolinesterase pela administração do brometo de piridostigmina em ratos submetidos a oclusão coronariana aboliu a disfunção autonômica, aumentando o tônus vagal e reduzindo o tônus simpático e conseqüentemente o balanço autonômico; esses achados levaram ao aumento da variabilidade da freqüência cardíaca mantendo a sensibilidade do barorreflexo e a pressão arterial em valores semelhantes aos controles

Finalmente, a estimulação colinérgica crônica pode ser considerada como ferramenta terapêutica na prevenção das lesões estruturais e funcionais associadas a isquemia provocada por oclusão coronariana.

8 Anexos

Tabela 3 - Tabela dos valores de PAS (em mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	125 ±3	123 ± 2	106 ± 3 *	120 ± 2 ⁺
21 dias	127 ± 2	129 ± 2	117 ± 1*	121± 1 ⁺
42 dias	125 ± 2	129±2	116 ± 2 *	124 ± 2 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 4 - Tabela dos valores de PAD (em mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	96 ± 3	90 ± 1	85 ± 3 *	90 ± 2
21 dias	96 ± 2	95 ± 1	86 ± 2*	90 ± 2
42 dias	97 ± 2	97 ±1	86 ± 1 *	89 ± 2

(* vs C, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 5 - Tabela dos valores de PAM (em mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	105 ± 3	106 ± 1	94 ± 4 *	103 ± 2 +
21 dias	107 ± 1	110 ± 1	99 ± 3 *	107 ± 2 +
42 dias	110 ± 4	109 ± 2	97 ± 2 *	109 ± 2 +

(* vs C, + vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 6 - Tabela dos valores de FC (em bpm) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	356 ± 12	358 ± 7	345 ± 7	347 ± 8
21 dias	340 ± 6	343 ± 4	314 ± 8*	335 ± 5 +
42 dias	351 ± 6	318 ± 5*	318 ± 2 *	348 ± 6+

(* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 7 - Tabela dos valores de PDF (em mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	4 ± 0,9	3 ± 0,3	10 ± 0,8 *	9 ± 0,7 *
21 dias	4 ± 0,6	5 ± 0,5	9 ± 0,6*	7 ± 0,4+
42 dias	3 ± 1,4	4 ± 0,8	12 ± 2,7 *	6 ± 0,4+

(* vs C, + vs I, ** $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 8 - Tabela dos valores de dP/dt positiva (em mmHg/ s) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	7457 ± 787	8167± 474	5476± 647*	6311± 663
21 dias	7234 ± 565	7636 ± 758	7491± 481	9522± 211**
42 dias	7523± 625	8900± 631	7124± 668	8556± 683**

(* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 9 - Tabela dos valores de dP/dt negativo (em mmHg/ s) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	-6180 ± 616	-5651±500	-3475± 171 *	-3866± 261*
21 dias	-6458±240	-6015± 83	-5390± 243*	-7893± 312 +
42 dias	-6659± 545	-5789±455	-3996± 447*	-6663± 239+

(* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 10 - Tabela dos valores de fração de ejeção (em %) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	78 ± 5	81 ± 4	47 ± 5*	54 ± 3
21 dias	79 ± 4	73 ± 4	31 ± 5*	47 ± 5+
42 dias	70 ± 3	74 ± 4	37 ± 4*	73 ± 4+

(* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 11 - Tabela dos valores de fração de encurtamento (em %) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	42 ± 2	44 ± 1	37 ± 2*	44 ± 2
21 dias	40 ± 2	43 ± 6	21 ± 2*	32 ± 3 ⁺
42 dias	40 ± 2	38 ± 2	20 ± 2*	38 ± 1 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, *⁺ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 12 - Tabela dos valores de tamanho do átrio (em cm) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,56 ± 0,03*	0,38 ± 0,01
21 dias	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,45 ± 0,02*	0,37 ± 0,01 ⁺
42 dias	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,4 ± 0,01*	0,37 ± 0,01 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, *⁺ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 13 - Tabela dos valores de desaceleração corrigido (ms) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	2,5 ± 0,18	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,4 ± 0,07 ^x
21 dias	2,7 ± 0,08	2,5 ± 0,12	2,0 ± 0,17* [▪]	2,5 ± 0,1 ⁺ ^x
42 dias	2,5 ± 0,01	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,01* [▪]	2,0 ± 0,01 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, [▪] vs I 7 dias, ^x vs IP 42 dias *⁺^x p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 14 - Tabela representativa dos valores acinesia (em %) de animais infartados I e IP em 7, 21 e 42 dias.

	I final	IP final
7 dias	17 ± 4,1	7 ± 2,9 ⁺
21 dias	31 ± 3,3	4 ± 3,9 ⁺
42 dias	31 ± 3,1	3 ± 3,1 ⁺

(⁺ vs IP24h, 21 e 42 dias, ⁺ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 15 - Tabela dos valores de BF do intervalo de pulso nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias (em %).

	C	P	I	IP
7 dias	24 ± 4	12 ± 4	45 ± 4	18 ± 4
21 dias	19 ± 3	18 ± 4	42 ± 4	24 ± 4
42 dias	26 ± 4	20 ± 4	43 ± 4	19 ± 3

(* vs C, ⁺ vs I, ⁺⁺ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 16 - Tabela representativa dos valores de AF (em %) do intervalo de pulso nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

(%)	C	P	I	IP
7 dias	76 ± 4	88 ± 4	55 ± 4	76 ± 3 ⁺⁺
21 dias	81 ± 3	82 ± 3	57 ± 4	75 ± 4 ⁺⁺
42 dias	74 ± 3	80 ± 4 [*]	58 ± 3	81 ± 3 ⁺⁺

(* vs C, ⁺ vs I, ⁺⁺ p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 17 - Tabela representativa dos valores de balanço autonômico cardíaco nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1*	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1**
21 dias	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1*	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1**
42 dias	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1*	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1**

(* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 18 - Tabela dos valores de variância do intervalo de pulso (ms²) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	116 ± 19	169 ± 20*	79 ± 17*	221 ± 20**
21 dias	90 ± 19	179 ± 14*	58 ± 19*	195 ± 17**
42 dias	119 ± 17	182 ± 19*	76 ± 15*	151 ± 16**

(* vs C, + vs I, ** p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 19 - Tabela dos valores de variância de PAS (mmHg²) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	33 ± 4	34 ± 3	31 ± 4	26 ± 5
21 dias	27 ± 4	34 ± 3	28 ± 4	36 ± 4
42 dias	32 ± 4	33 ± 4	33 ± 3	35 ± 3

Tabela 20 - Tabela dos valores de taquicardia reflexa (em bpm/ mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	2,7 ± 0,12	3,6 ± 0,15*	1,6 ± 0,14 *	2,5 ± 0,32 ⁺
21 dias	2,7 ± 0,14	3,3 ± 0,07*	1,5 ± 0,12*	2,6 ± 0,18 ⁺
42 dias	2,2 ± 0,21	3,4 ± 0,12 *	1,2 ± 0,11 *	2,5 ± 0,25 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, ^{**} p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 21 - Tabela dos valores de bradicardia reflexa (em bpm/ mmHg) nos animais do grupo de 7, 21 e 42 dias.

	C	P	I	IP
7 dias	-1,3 ± 0,01	-2,4 ± 0,12*	-0,5 ± 0,05 *	-1,9 ± 0,14 ⁺
21 dias	-1,3 ± 0,01	-2,3 ± 0,18 *	-0,5 ± 0,07*	-1,8 ± 0,36 ⁺
42 dias	-1,3 ± 0,02	-2,4 ± 0,17 *	-0,6 ± 0,02*	-1,9 ± 0,34 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, ^{**} p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 25 - Tabela dos valores percentuais de bradicardia (%) após a estimulação elétrica do nervo vago os animais do grupo de 7 dias.

	C	P	I	IP
2 Hz	-2 ± 2	-19 ± 6*	-4 ± 2	-14 ± 3 ^{**}
4 Hz	-12 ± 3	-44 ± 13*	-4 ± 3	-34 ± 6 ^{**}
8 Hz	-35 ± 7	-55 ± 11*	-28 ± 10	-51 ± 3 ^{**}
16 Hz	-59 ± 11	-53 ± 6	-52 ± 19	-56 ± 8

(* vs C, ⁺ vs I, p ≤ 0.05 considerado significativo).

Tabela 26 - Tabela dos valores de valores percentuais de bradicardia (%) após a estimulação elétrica do nervo vago nos animais do grupo de 21 dias.

	C	P	I	IP
2 Hz	-4 ± 2	-10 ± 3*	-2 ± 10	-8 ± 14 ⁺
4 Hz	-12 ± 3	-24 ± 6*	-7 ± 10	-16 ± 9 ⁺
8 Hz	-29 ± 10	-33 ± 5*	-17 ± 7	-34 ± 11 ⁺
16 Hz	-41 ± 14	-65 ± 6*	-37 ± 11	-80 ± 8 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 27 - Tabela dos valores percentuais de bradicardia (%) após a estimulação elétrica do nervo vago nos animais do grupo de 42 dias.

	C	P	I	IP
2 Hz	5 ± 1	-3 ± 2	-6 ± 2	-5 ± 3
4 Hz	-12 ± 2	-9 ± 6	-12 ± 5	-14 ± 6
8 Hz	-21 ± 6	-18 ± 9	-24 ± 2	-35 ± 5 ⁺
16 Hz	-38 ± 5	-48 ± 13	-38 ± 6	-53 ± 6 ⁺

(⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 28 - Tabela dos valores percentuais de bradicardia (%) após a infusão de metacolina nos animais nos animais do grupo de 7 dias.

(%)	C	P	I	IP
1,25 µg	-45±11	-54±7	-64±11	-65±23
2,5 µg	-53±13	-52±15	-62±14	-61±32
5µg	-65±26	-55±1	-28±7	-94±23 ⁺

(* vs C, ⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 29 - Tabela valores percentuais de bradicardia (%) após a infusão de metacolina nos animais do grupo de 21 dias .

	C	P	I	IP
1,25 µg	-36±10	-39±9	-33±14	-67±8
2,5 µg	-52±14	-62±9	-40±10	-75±9
5 µg	-68±10	-73±25	-44±16	-81±11 ⁺⁺

(* vs C, ⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

Tabela 30 - Tabela dos valores percentuais de bradicardia após a infusão de metacolina nos animais nos animais do grupo de 42 dias.

	C	P	I	IP
1,25 µg	-34±17	-62±14	-46±10	-29±13
2,5 µg	-68±20	-85±5	-52±12	-16±5 ⁺
5µg	-53±26	-80±1	-61±7	-29±1 ⁺

(⁺ vs I, $p \leq 0.05$ considerado significativo).

9 Referências Bibliográficas

ANDRONE A S, HRYNIEWICZ K, GOLDSMITH R, ARWADY A S, KATZ D., Acetylcholinesterase inhibition with Pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. **Heart**, (2003); 89:854–858.

ANVERSA P, BEGHI C, KIKKAWA Y, OLIVETTI G., Myocardial response to infarction in the rat. II. Morphometric measurements of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. **American Journal of Pathology**. (1985a); 118:484-492.

AZEVEDO E R, PARKER JD. Parasympathetic Control of Cardiac Sympathetic Activity Normal Ventricular Function Versus Congestive Heart Failure . **Circulation**, (1999); 100: 274-279.

BANAI S, SHWEIKI D, PINSON A, CHANDRA M, LAZAROVICI G, KESHET E, Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. **Cardiovasc Res**. (1994a);

BANGALORE S, YAO SS, CHAUDHRY FA. Role of left atrial size in risk stratification and prognosis of patients undergoing stress echocardiography. **J Am Coll Cardiol**. (2007) 25;50(13):1254-62.

BIBEVSKI S, DUNLAP ME., Ganglionic mechanisms contribute to diminished vagal control in heart failure, **Circulation**, (1999), 2958-2963

BERNI V, FIORINO P, IRIGOYEN MCC, LACCHINI S, End-organ damage and cardiac dysfunction in sinoaortic denervation-induced AP lability in rats, **Journal of Hypertension**, (2004), V:22, 27S, suppl I.

BEHLING A, MORAES RS, ROHDE LE, FERLIN EL, NÓBREGA AC, RIBEIRO JP., Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. **Am Heart J**. (2003), 146(3): 494-500

BERNER A, AL SUWAIDI J, EL-MENYAR A, GEHANI, The effect of hypertension as a predictor of risk for congestive heart failure patients over a 10-year period in a newly developed country. **Blood Pressure**; (2004); 13(1): 41-6.

BILLMAN GE, SCHWARTZ HK, STONE. Baroreceptor reflex control of heart rate: a predictor of sudden cardiac death. **Circulation** 1982; 66: 874.

CAMPAGNOLE-SANTOS M.J., HAIBARA A.S.; Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial **Rev Bras Hipertens**, (2001) (8): 30-40.

CAMPOS FILHO O, GI MA, TATANI SB. F, SERRANO JR., Ecocardiografia doppler. **In: Nobre CV. Tratado de cardiologia da Socesp**. (2005). 179-215.

CARRIER GO, ARONSTAM RS. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. **J Pharmacol Exp Ther**. (1987); 242(2):531-5.

CASADEI B, PIPILIS A, SESSA F, CONWAY J, SLEIGHT P. Low doses of scopolamine increase cardiac vagal tone in the acute phase of myocardial infarction. **Circulation**; (1993); 88(2):353-7.

CHERYL CHY, KUO BJ, Assessment of cardiac sympathetic regulation by respiratory-related arterial pressure variability in the rat, **Journal of Physiology**, (1999), 515.3; 887-889.

CORR P, PEARLE D, HINTON J, ROBERTS W, GILLIS R. Site of myocardial infarction: a determinant of the cardiovascular changes induced in the cat by coronary occlusion. **Circ. Res.** (1976); 39:840-847.

DALY M de B. Aspects of the integration of the respiratory and cardiovascular systems In: **Cardiovascular Regulation**, Ed. D. Jordan e L. Marshall. Londres: Physiological Society/ Portland Press, (1995),15-25.

DALL'AGO P, SILVA VO, DE ANGELIS KL, IRIGOYEN MC, FAZAN R JR, SALGADO HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res.** (2002); 35(7):843-9.

DE ANGELIS, K., LEIRNER, A.A., IRIGOYEN, M.C., CESTARI, I.A. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. **Artif Organs**; (2001); 25(11):939-43.

DE LA FUENTE RN., Efeito da estimulação colinérgica em ratos normais; São Paulo, Tese de conclusão de curso, Faculdade de Biomedicina da Universidade de Santo Amaro. (2003)

DE LA FUENTE RN, SOARES PPS, GODINHO R, FLUES K, PAULINI J, IRIGOYEN MC.; Enhancement of vagal-mediated heart rate responsiveness

by cholinergic stimulation in rats, ***Journal of Hypertension***, (2004), V:22, 16S, suppl I.

DE LA FUENTE RN, SILVA ICM, LACCHINI S, KRIEGER EM, IRIGOYEN MC, Pyridostigmine increase vagal responsiveness and improves autonomic balance in rats, (2007). S23.

DE FERRARI GM, SALVATI P, GROSSONI M, UKMAR G, VAGA L, PATRONO C, SCHWARTZ PJ. Pharmacologic modulation of the autonomic nervous system in the prevention of sudden cardiac death. A study with propranolol, methacholine and oxotremorine in conscious dogs with a healed myocardial infarction., ***J Am Coll Cardiol***, (1993), 21: 283-290.

DE FERRARI GM, MANTICA M, VANOLI E, HULL SS JR, SCHWARTZ PJ. Scopolamine increases vagal tone and vagal reflexes in patients after myocardial infarction. ***J Am Coll Cardiol*** 1993; 22: 1327-34.

DEVEREUX RB, REICHEK N., Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. ***Circulation***. (1977);55(4):613-8.

ECKBERG DL, DRABINSKY M, BRAUNWALD E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. ***N. Engl. J. Med.*** (1971); 285: 877–883.

ELIAKIM M, BELLET S, TAWIL E, MULLER O. Effect of vagal stimulation and acetylcholine on the ventricle. Studies in dogs with complete atrioventricular block. ***Circ Res***, (1961), 9:1372-9.

ELSNER D, RIEGGER GA. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. **Cur Opin Cardiol.** (1995); 10: 253-259.

FERRARI, A. U., DAFFONCHIO, A., FRANZELLI, C. & MANCIA, G. Cardiac parasympathetic hyperresponsiveness in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, (1992), 19:653-7.

FRANCHINI KG, KRIEGER EM. Bradycardic responses to vagal stimulation and methacholine injection in sinoaortic denervated rats. **Brazilian J Med Biol Res**, (1989); 22:757-760.

FRANCHINI KG, KRIEGER EM Neurogenic hypertension in rat. **In: Handbook of hypertension**, Experimental and Genetic Models of Hypertension. D. Ganten e W. de Jong, **Eds. Elsevier Science BV**, (1994): V 16; 472-500.

FRANCIS J, WEISS RM, WEI SG, JOHNSON AK, FELDER RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** (2001); 281: R1734–R1745.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Science**, (1980);288:373–6.

GRABE-GUIMARÃES A, ALVES LM, TIBIRIÇÁ E, NÓBREGA ACL, Pyridostigmine blunts increases in myocardial oxygen demand elicited by the stimulation of the central nervous system in anesthetized rats. **Clinical Autonomic Research** (1999); 9(2): 83-89.

GRAHAM LN, SMITH PA, STOKER JB, MACKINTOSH AF, MARY DA. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. **Circulation**. (2002); 106: 793–797.

GRASSI G, SERAVALLE G, GIANNATTASIO C, SAINO A, TURRI C, MANCIA G., Baroreflex and non-baroreflex modulation of vagal cardiac control after myocardial infarction. **Am J Cardiol**. 1999; 1; 84 (5):525-529.

GRASSI G, SERAVALLE G, CALHOUN DA, MATTURRI M, MANCIA G, ZANCHETTI A. Monitoring of sympathetic activity in man: physiology and pharmacology. **Eur Heart J**. (1992);13 Suppl A:22-5

GHEORGHIAD E M, SHIVKUMAR K, SCHULTZ L, JAFRI S, TILLEY B, GOLDSTEIN S. Prognostic significance of electrocardiographic persistent ST depression in patients with their first myocardial infarction in the placebo arm of the Beta- Blocker Heart Attack Trial. **Am Heart J** (1993), 126: 271-8.

Hare JM, Givertz MM, Creager MA, Colucci WS. Increased sensitivity to nitric oxide synthase inhibition in patients with heart failure: potentiation of beta-adrenergic inotropic responsiveness. **Circulation**. (1998); 20;97(2):161-6.

IRIGOYEN MC, LACCHINI S, DE ANGELIS K, MICHELINI LC, Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo** , (2003) 13:10-15.

IRIGOYEN MC, CESTARI IA, MOREIRA ED, OSHIRO MS & KRIEGER EM. Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *Braz J Med Biol Res*, (1988) 21:869-72.

IRIGOYEN, M. C., MOREIRA, E. D., IDA, F., PIRES, M., CESTARI, I. A. & KRIEGER, E. M. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*, (1995). 26:1111-6.

JANSZKY I, ERICSON M, LEKANDER M, BLOM M, BUHLIN K, GEORGIADES A, AHNVE S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. *J Intern Med*. (2004) Nov;256(5):421-88

JORDAN D, Central nervous integration of cardiovascular regulation. In *Cardiovascular Regulation*, Ed. D.Jordan e J Marshall. Londres: Physiological, Society/ Portland Press, (1995): 3-16

KEIGER RE, MILLER JP, BIGGER JR. Heart rate variability: a variable predicting mortality following acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* (1984); 3: 547

KOIKE MK, MOREIRA ED, DA SILVA GJ, CONSOLIM-COLOMBO FM, IDA F, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM. Resetting of aortic baroreceptors in response to hypotension does not alter gain sensitivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. (2006); 33(8):679-84.

KOLKA M A & STEPHENSON, L. A. Human temperature regulation during exercise after oral pyridostigmine administration. *Aviat Space Environ Med*, (1990). 61:220-4.

KOSTIS JB, BYINGTON R, FRIEDMAN LM, GOLDSTEIN S, FURBERG C. Prognostic significance of ventricular ectopic activity in survivors of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* (1987); 10: 231-42.

KRIEGER EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Circulation Research*, (1964). 15:511-21.

KRIEGER EM. The acute phase of neurogenic hypertension in the rat. *Experientia*, 2. (1970). 6:628-9.

KRIEGER EM, MICHELINI L. Dados basicos sobre a manutenção da pressão arterial, *Rev Soc Cardiol ESP*, (1992), 4:9-17.

KRUGER C, KALENKA A, HAUNSTETTER A, SCWEIZER M, MAIER C, RUHLE U, EHMKE H, KUBLER W, HAASS M. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. *Heart Circ Physiol*. (1997); 42: H2240-H2247

LACERDA JE de C. Estudo da Atividade Simpática em ratos submetidos ao Infarto do Miocárdio. São Paulo: (2000). (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo)

LACERDA JE, CONSOLIM-COLOMBO FM, MOREIRA ED, IDA F, SILVA GJ, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM. Influence of cardiopulmonary reflex on

the sympathetic activity during myocardial infarction. *Auton Neurosci.* (2006).

LA ROVERE MT, PINNA GD, MAESTRI R, MORTARA A, CAPOMOLLA S, FEBBO O, FERRARI R, FRANCHINI M, GNEMMI M, OPASICH C, RICCARDI PG, TRAVERSI E, COBELLI F., Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients, *Circulation.* (2003), 4;107(4):565-70.

LA ROVERE MT, BIGGER JT JR, MARCUS FI, MORTARA A, SCHWARTZ PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet.* (1998) 14; 351(9101):478-84.

LA ROVERE MT, MORTARA A, PANTALEO P, MAESTRI R, COBELLI F, TAVAZZI L., Scopolamine improves autonomic balance in advanced congestive heart failure. *Circulation*, 1994, 90(2):838-43.

LEVY MN, SCHWARTZ PJ. Vagal control of the heart: Experimental basis and clinical applications. Armonk: Futura Publishing, 1994: 644.

LIU YH, YANG XP, NASS O, SABBAH HN, PETERSON E, CARRETERO OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol.* (1997); 272(2, Pt 2): H722-7.

MALIK M, CAMM AJ. Components of heart rate variability--what they really mean and what we really measure. *Am J Cardiol.* (1993) 1;72(11):821-2

MANCIA G, GRASSI. Arterial baroreflex and other cardiovascular reflexes in hypertension, *In: Text book of Hypertension*, edit by J.D. Swales, Ed. Black Well Scientific publication, (1994) 11-21

MARK AL. The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. *J Am Coll Cardiol.* (1983); 1(1):90-102

MARINO MT, SCHUSTER BG, BRUECKNER RP, LIN E, KAMINSKIS A, LASSETER KC. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of piridostigmine bromide for prophylaxis against nerve agents in humans. *J Clin Pharmacol* (1998); 38(3): 227-35.

MARTINS JB, ZIPES DP. Effects of sympathetic and vagal nerves on recovery properties of the endocardium and epicardium of the canine left ventricle. *Circ Res*, (1980), 46:100-110.

MATHEY D, BLEIFELD W, HANRATH P, EFFERT S. Attempt to quantitative relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction. *Br. Heart J.* 1974; 36: 271-279.

MEYRELLES, S.S., MONTEIRO, K.C., CABRAL, A.M. e VASQUEZ, E.C. Impairment of the reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Br J Med Biol Res*; (1994); 27: 1065-9,.

MILL JG, STEFANON I, LEITE CM, VASSALLO DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res.* (1990); 24(9): 748-753.

MILL, J.G., VASSALO, D.V., LEITE, C.M. Time courses changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res*; 24:855-858, 1991.

MILL JG, MILANEZ MDA C, BUSATTO VC, DE MORAES AC, GOMES MDA G., Activation of the cardiac angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction and its role in ventricular remodeling. *Arq Bras Cardiol.* (1997);69(2):101-10.

MIRCOLI L, FEDELE L, BENETTI M, BOLLA GB, RADAELLI A, PERLINI S, FERRARI AU. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. *Circulation.* (2002); 106: 866–872.

MOSER M, LEHOFER M, SEDMINEK A,I. Heart rate variability as a prognostic tool in cardiology. A contribution to the problem from a theoretical point of view. *Circulation* (1994); 90: 1078-82.

NÓBREGA AC, DOS REIS AF, MORAES RS, BASTOS BG, FERLIN EL, RIBEIRO JP Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res.* (2001);11(1):11-7.

NOBREGA ACL, CARVALHO ACG, BASTOS BG. Resting and reflex heart rate response during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. *Brasilian J. Med Biol. Res.*, (1996) 29: 1461-1465.

NOBREGA ACL, CARVALHO ACG, SANTOS KB, SOARES PPS. Pyridostigmine blunts the cardiac response to mental stress. *Clin Auton Res.* (1999); 9:1-6.

OSCOLATI G, GRASSI G, GIANNATTASIO C, SERAVALLE G, VALAGUSSA F, ZANCHETTI A, MANCIA G. Early alterations of the baroreceptor control of heart rate in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**. (1990); 81(3):939-48.

PAGANI M, LOMBARDI F, GUZZETTI S, RIMOLDI O, FURLAN R, PIZZINELLI P, SANDRONE G, MALFATTO G, DELL'ORTO S, PICCALUGA E.. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ Res**, (1986) 59:178-93.

PAULUS WJ, SHAH AM. NO and cardiac diastolic function. **Cardiovasc Res** (1999);43:595–606.

PAWLUSH DG, MOORE RL, MUSCH TI, DAVIDSON WR JR. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. **J Appl Physiol** (1993); 74 (5): 2598-605

PEDRETTI R, COLOMBO E, BRAGA SS, CARÚ B. Influence of scopolamine on cardiac sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol** (1993); 72: 384-92.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, FISHBEIN PJ, SPADARO J, KLONER RA, BRAUNWALD E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ Res**. (1979);; 44 (4); 503.

PFEFFER JM, PFEFFER MA, FLETCHER PJ, BRAUNWALD E, PROGRESSIVE Ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. **Am J Physiol**. (1999); 206 (5 Pt 2) : H1406-14

PFEFFER JM, PFEFFER MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. ***Circ Res.*** (1985); 57(1):84-95.

PONTES PV, BASTOS BG, MESQUITA ET, NOBREGA ACL., Cholinergic stimulation with pyridostigmine echocardiography analysis in health subjects. ***J Am Coll Cardiol,*** (1998), 31(5) 433C.

REIS AF, MOARAI RS, BASTOS BG, FERLIN E, RIBEIRO JP, NÓBREGA ACL., Heart rate variability during cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. ***J Am Coll Cardiol,*** (1998), 31 (5): 407 C.

RONDON E, BRASILEIRO-SANTOS MS, MOREIRA ED, RONDON MU, MATTOS KC, COELHO MA, SILVA GJ, BRUM PC, FIORINO P, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM, MIDDLEKAUFF HR, NEGRÃO CE. Exercise training improves aortic depressor nerve sensitivity in rats with ischemia-induced heart failure. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol.*** (2006);291(6):H2801-6.

ROVEDA F, ROLIM N, REIS SF. Exercício físico e insuficiência cardíaca. ***In: Negrao CE, Barreto ACP. Cardiologia do Exercício.*** (2005) : p. 179-189

SABBAH HN, IMAI M, ZARETSKY A, RASTOGI S, WANG M, JIANG A, ZACA V. Therapy with vagus nerve electrical stimulation combined with beta blockade improves left ventricular function in dogs with heart failure beyond that seen with beta blockade alone. ***Eur J Heart Fail*** (2007); 6: 1-14.

STRAMBA-BADIALE M, VANOLI E, DE FERRARI GM, CERATI D, FOREMAN RD, SCHWARTZ PJ. Sympathetic-parasympathetic interaction and accentuated antagonism in conscious dogs. **Am J Physiol.** (1991); 260(2 Pt 2):H335-40. 28: 1176-1179.

SAHN, DJ, DE MARIA, A, KISSLO, J, WEYMAN, A . Recommendations Regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiography Measurements. **Circulation**, (1978) 56 (6), 1072-83.

SERRA SM, VIVACQUA R, RAMALHO SHR, SANTOS KB, BASTOS BG, NOBREGA ACL. Cardiopulmonary exercise test during cholinergic stimulation with pyridostigmine in health subjects. **J Am Cardiol** (1998): 31 (suppl C): 407 C.

SCHULTZ HD. Cardiac vagal Chemosensory afferents. Function in pathophysiological states. **Ann N Y Acad Sci**, (2001); 940: 59-73.

SCHWARTZ PJ, VERRIER PL, LOWN B Effect of splanchnicectomy and vagotomy on ventricular refractoriness, **Circ Res**, (1977), 40: 536-540

SCHWARTZ PJ. The autonomic nervous system and sudden death. **Eur Heart J**, (1998)19 Suppl F:F72-80.

SIMÕES MV, MARQUES F, O'CONNELL JL. Diagnóstico classificatório e avaliação prognóstica da insuficiência cardíaca. **In: Nobre F. e Serrano Jr CV. Tratado de cardiologia da Socesp.** 2005: p.750-761.

SINGER , W. , OPFER - GEHRKING , T.L. ,NICKANDER , K.K. , HINES , S.M. AND LOW ,P.A. Acetylcholinesteraseinhibition in patients with

orthostatic intolerance . ***Journal of Clinical Neurophysiology*** , (2006); (23) , 477 – 82 .

SOARES PP, DA NOBREGA AC, USHIZIMA MR, IRIGOYEN MC., Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats, ***Auton Neurosci.*** (2004), 113(1-2):24-31.

STEIN PK, KLEIGER RE., Insights from the study of heart rate variability. ***Annu Rev Med,*** (1999); 50: 249-61.

STEIN RD, BACKMAN SB, COLLIER B, POLOSA C. Bradycardia produced by pyridostigmine and physostigmine. ***Can J Anaesth.*** (1997);44(12):1286-92.

STEFANON I, MARTINS MA, VASSALLO DV, MILL JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. ***Braz J Med Biol Res.*** (1994); 27(11): 2667-79.

STEPHENSON LA, KOLKA MA, Acetylcholinesterase inhibitor, pyridostigmine bromide, reduces skin blood flow in humans. ***Am J Physiol.*** (1990); 258 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 27): R951-R957.

SU DF & MIAO CY. Blood pressure variability and organ damage. ***Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*** (2001) 28, 709 – 715.

Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology , Heart Rate Variability, Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use, ***European Heart Journal,*** (1996) 17, 354 -381.

TAKESHITA A, MATSUGUCHI H, NAKAMURA M. Effect of coronary occlusion on arterial baroreflex control of heart rate. *Cardiovasc Res.* (1980); 14(5):303-6.

TAYLOR P. Anticholinesterase agents. In *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. J. G. Hardman & L. E. Limbird. New York: McGraw-Hill, (1996), pp. 161-176.

TEMPORELLI PL, GIANNUZZI P, NICOLOSI GL, LATINI R, FRANZOSI MG, GENTILE F, TAVAZZI L, MAGGIONI AP; GISSI-3 Echo Substudy Investigators. Doppler-derived mitral deceleration time as a strong prognostic marker of left ventricular remodeling and survival after acute myocardial infarction: results of the GISSI-3 echo substudy. *J Am Coll Cardiol.* (2004) 5;43(9):1646-53.

TRACEY KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* (2007);117(2):289-96.

UNGER EF. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res.* (2001); 49: 497-506.

VANOLI E, CERATI D & PEDRETTI RF. Autonomic control of heart rate: pharmacological and nonpharmacological modulation. *Basic Res Cardiol*, (1998). 93:133-42.

VYBIRAL T, GLASER DH, MORRIS G, HESS KR, YANG K., FRANCIS M, PRATT C. Effect of low dose of scopolamine in heart rate variability in acute myocardial infarction. *JACC*, (1993), 22: 1320-6.

YUSUF S, ANAND S, AVEZUM A JR, FLATHER M, COUTINHO M. Treatment for acute myocardial infarction. Overview of randomized clinical trials. *Eur Heart J*. 1996 Dec; 17 Suppl F: 16-29.

WAXMAN MB, CUPPS CL, CAMERON DA. Modulation of an cardioventricular rhythm by vagal tone. *J Am Coll Cardiol*, (1988) 11: 1052-1060

WAXMAN MB, WALD RW. Recurrent paroxysmal supraventricular tachycardia: a complication of ventricular pacing in a patient with occult Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Electrocardiol*. (1977);10(3):291-8.

WEBB SW, ADAGEY AA, PANTRIDGE JF. Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *Br. Med. J.*, (1972), 3:89-92.

WOLF MG, Varigos G, Hunt D. Sinus arrhythmia in acute myocardial infarction. *Med J Aust* 1978; 2: 52.

ZHANG L, HU D, LI J, WU Y, LIU X, YANG X. Antibodies against the myocardial beta1-adrenergic and M2-muscarinic receptors in patients with congestive heart failure. *Clin Med J (Engl)* (2002); 115: 1127-1131.