

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Luciana Mesquita Passamani

**PERFIL TEMPORAL E MECANISMOS DE HIPERATIVIDADE
SIMPÁTICA APÓS LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA
NA PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO
ISOLADOS DE RATOS**

VITÓRIA

2014

LUCIANA MESQUITA PASSAMANI

**PERFIL TEMPORAL E MECANISMOS DE HIPERATIVIDADE
SIMPÁTICA APÓS LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA
NA PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO
ISOLADOS DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Karla Nívea Sampaio

VITÓRIA

2014

Passamani, Luciana Mesquita

Perfil temporal e mecanismos de hiperatividade simpática após ligadura da artéria coronária na preparação tronco cerebral-corção isolados de ratos / Luciana Mesquita Passamani – 2014.

109 p.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

Tese de doutorado – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Atividade simpática 2. Ligadura da coronária 3. Ratos I. Título

LUCIANA MESQUITA PASSAMANI

**PERFIL TEMPORAL E MECANISMOS DE HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA APÓS
LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA NA PREPARAÇÃO TRONCO
CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADOS DE RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ de ____ de _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Geraldo Mill
Depart^o. de Ciências Fisiológicas – UFES
Orientador

Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio
Depart^o. de Ciências Farmacêuticas – UFES
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Depart^o. de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto
Depart^o. de Ciências Fisiológicas – EMESCAM

Prof. Dr. Julian Francis Richmond Paton
Depart^o. de Fisiologia e Farmacologia – Universidade de Bristol / Reino Unido

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon
Depart^o. de Ciências Fisiológicas – UFES
Coordenadora do PPGCF – UFES

Os experimentos realizados na preparação tronco cerebral-coração isolados foram realizados na Universidade de Bristol no Reino Unido, sob orientação do Prof. Dr. Julian Francis Richmond Paton.

AGRADECIMENTOS

A Deus, à Nossa Senhora e à Santa Rita de Cássia, por esta conquista;

Aos meus queridos pais, Marcio e Vânia, por todo amor e incentivo. Também ao meu namorado Ricardo e aos demais familiares e amigos, que compartilham sempre de minha felicidade;

À Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio, por guiar meus caminhos profissionais no Brasil e no exterior, oferecendo-me sua orientação, confiança e acima de tudo sua amizade; pelas palavras incentivadoras que me fizeram seguir adiante em todos os momentos de incerteza e por ser uma pessoa gentil e maravilhosa sempre.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Mill, pela acolhida em seu laboratório, por todas as oportunidades oferecidas para realização do meu doutorado e pela sua orientação.

Ao Prof. Dr. Julian Francis Richmond Paton, pela oportunidade de realizar meu doutorado sanduíche em seu laboratório na Universidade de Bristol / Reino Unido e por toda a sua valiosa orientação durante a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Abdala, pelo apoio prestado nos experimentos na Universidade de Bristol. Agradeço também a ela e ao seu esposo Bobby pela maravilhosa companhia e amizade durante minha vivência no exterior.

Ao Prof. Dr. Benedito Honório Machado e ao Dr. Davi José de Almeida Moraes, por toda a assistência, que possibilitou dar início a este trabalho.

A todos os demais professores do PPGCF / UFES, pela contribuição em minha formação.

A todos os funcionários do PPGCF / UFES, pelos serviços prestados.

Aos amigos do laboratório no PPGCF / UFES: Rebeca, Marcelo, Ludimila, Gabriela, Enildo, Eduardo, Marcela e demais. Agradeço pelo apoio, pelos ensinamentos e pela amizade.

A todos os amigos do PPGCF / UFES, que conquistei desde a realização do meu mestrado, pela amizade e companhia dentro e fora da universidade (não listarei os nomes para não correr o risco de esquecer alguém).

Às amigas Priscila, Maylla, Bruna, Mirian e Lorena, pelo apoio e aventuras vivenciadas no exterior.

À minha amiga Melina, pela ajuda em todos os momentos de minha vivência em Bristol. Agradeço pela ajuda profissional dentro da universidade, mas, em especial, pelo seu carinho e pela sua ajuda sempre espontânea. E agradeço também a esta Guria por nossas viagens inesquecíveis! Foram muitas aventuras e momentos especiais regados de amizade, que me trouxeram alegria e força para continuar.

A todos alunos e pesquisadores da Universidade de Bristol, pela ótima recepção, paciência, ensinamentos e amizade. Em destaque: Melina, Ana Paula, Catherine, Joyce, Wioletta, Jean-Charles, Dawid, Eva, Beihui, Tom Cruise, Tom Curry, Feige, Samantha, Renata, Erin, Lauren, John, Fiona, Serena, Linford, James, Paul, Marie, Ana, Emma e demais.

A todos aqueles que me esqueci de mencionar, agradeço pelo apoio.

RESUMO

Objetivo: A associação entre isquemia miocárdica e hiperatividade simpática vem sendo há muito tempo avaliada. Nós investigamos o curso temporal e os mecanismos de ativação do sistema nervoso simpático logo após a ligadura da artéria coronária.

Métodos e Resultados: A preparação tronco cerebral-coração isolados, *in vitro*, foi utilizada para registrar as atividades dos nervos frênico (ANF) e simpático torácico (ANSt), frequência cardíaca (FC), eletrocardiograma (ECG) e pressão de perfusão (PP) de ratos Wistar. A ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (grupo DAE) ou “ligadura fictícia” (grupo Sham) foram realizadas *in vitro*. O corante azul de Evans, injetado ao final dos experimentos, demarcou, para os animais que sofreram ligadura da DAE, uma área miocárdica em risco de $36,3 \pm 1,1$ % do ventrículo esquerdo, ao passo que nenhuma área em risco foi demarcada no grupo Sham. Os registros obtidos foram avaliados ao longo de uma hora após os procedimentos de ligadura da DAE ou de “ligadura fictícia” no grupo Sham. Foi observado um aumento na ANSt dentro de 30 minutos no grupo DAE, alcançando níveis ainda mais elevados em 60 minutos quando comparado ao grupo Sham (ANSt Grupo DAE – basal: $2,5 \pm 0,2$; 30 min: $3,5 \pm 0,3$; 60 min: $5,2 \pm 0,5$ μV ; $P < 0,01$ versus ANSt grupo Sham – basal: $2,2 \pm 0,3$; 30 min: $2,2 \pm 0,3$; 60 min: $2,3 \pm 0,3$ μV ; $P > 0,05$). Houve um aumento significativo dos níveis basais de FC 45 minutos após ligadura da DAE ($P < 0,01$); não tendo o mesmo efeito sido observado no grupo Sham. A função autonômica reflexa e tônica foi avaliada 60 minutos após ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” e os seguintes efeitos foram observados: (i) Uma exacerbação da resposta simpato-excitatória quimiorreflexa frente a três diferentes doses de cianeto de sódio (NaCN 0,03 % – doses 25, 50 e 75 μL : 49,7; 45,3 e 26,8 % de aumento, respectivamente, quando comparado à ativação com as mesmas doses no grupo Sham; $P < 0,01$). (ii) Uma resposta pressora elevada frente à administração de fenilefrina (DAE: $31,5 \pm 1,3$ versus Sham: $23,1 \pm 1,2$ mmHg; $P < 0,01$) e um ganho barorreflexo simpático deprimido (DAE: $1,3 \pm 0,1$ versus Sham: $2,0 \pm 0,1$ $\% \cdot \text{mmHg}^{-1}$; $P < 0,01$) no grupo DAE quando comparado ao Sham. (iii) Um tono simpático cardíaco elevado no grupo DAE, evidenciado pelo bloqueio com atenolol, quando comparado ao grupo Sham (ΔFC após atenolol – DAE: $-107,8 \pm 8,0$ versus Sham: $-81,6 \pm 7,4$ bpm, $P < 0,05$). (iv) Em contrapartida, o tono vagal bem como as respostas bradicárdicas barorreflexa e quimiorreflexa não foram diferentes

estatisticamente entre os grupos DAE e Sham. Os procedimentos desenvolvidos para a investigação dos possíveis mecanismos mediando simpato-excitação mostraram: (v) O envolvimento de receptores de angiotensina tipo 1 na sustentação da simpato-excitação, uma vez que o bloqueio com losartan reduziu a ANSt 3 horas após ligadura da DAE (33,8 % de atenuação quando comparado ao grupo DAE que recebeu somente Salina; $P < 0.05$). (vi) A participação do reflexo cárdio-cárdaco simpático espinhal mediando as mudanças iniciais na atividade simpática, uma vez que ratos com transecção espinhal ainda apresentaram hiperatividade simpática após ligadura da DAE.

Conclusão: O sistema nervoso simpático é ativado imediatamente após ligadura da DAE no rato, sendo esta ativação mediada por mecanismos espinhais e, secundariamente, sustentada por mecanismos angiotensinérgicos bem como por aumento concomitante de reflexos simpato-excitatórios.

Palavras Chaves: Atividade no Nervo Simpático; Baroreflexo; Quimio-reflexo; Infarto Agudo do Miocárdio; Reflexo Cardio-Pulmonar.

ABSTRACT

Aim: The association between myocardial ischaemia and sympathetic over activity has long been evaluated. We investigated the time course and the mechanisms underlying sympathoexcitation immediately following coronary ligation.

Methods and Results: The working heart brainstem preparation was used to record phrenic and thoracic sympathetic (tSNA) nerves activities, heart rate (HR), electrocardiogram (ECG) and perfusion pressure of Wistar rats. The ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) (LAD group) or “fictitious ligation” (Sham group) was performed in vitro. The myocardial area at risk was $36.3 \pm 1.1\%$ of the left ventricle and it was assessed post-hoc with Evans blue dye at the end of the experiment; no area at risk was observed in Sham group. Recordings were evaluated over the course of one hour post LAD ligation or “fictitious ligation” and there was an increased tSNA within 30 min, reaching even higher levels at 60 min in LAD group (basal: 2.5 ± 0.2 , 30 min: 3.5 ± 0.3 , 60 min: 5.2 ± 0.5 μV , $P < 0.01$ versus Sham group – basal: 2.2 ± 0.3 , 30 min: 2.2 ± 0.3 , 60 min: 2.3 ± 0.3 μV , $P > 0.05$). HR increased 45 min post LAD ligation ($P < 0.01$ compared to basal); there was no HR changes in Sham group. The reflex and tonic autonomic function were assessed 60 minutes post LAD ligation or “fictitious ligation” and there was: (i) A greater sympathoexcitatory chemoreflex response to three different doses of NaCN (0.03 % – 25, 50 and 75 μL : 49.7, 45.3 and 26.8 % of increase, respectively, compared to similar doses in Sham, $P < 0.01$). (ii) An elevated pressor response (LAD 31.5 ± 1.3 versus Sham 23.1 ± 1.2 mmHg, $P < 0.01$) and depressed sympathetic baroreflex gain (LAD 1.3 ± 0.1 versus Sham 2.0 ± 0.1 %. mmHg^{-1} , $P < 0.01$) to phenylephrine. (iii) An elevated cardiac sympathetic tone (changes in HR after atenolol: LAD -107.8 ± 8.0 versus Sham -81.6 ± 7.4 bpm, $P < 0.05$). (iv) In contrast, there were no changes in cardiac vagal tone and bradycardic response to both the baroreflex and chemoreflex between LAD and Sham groups. The investigation of mechanisms driving up sympathoexcitation showed: (v) The involvement of angiotensin type 1 receptor sustaining sympathoexcitation, since losartan blockade blunted tSNA at 3 h after LAD ligation (33.8 % of attenuation compared to Control Saline-LAD group, $P < 0.05$). (vi) The role of spinal sympathetic cardiocardiac reflex mediating the initial changes

in sympathetic activity, because spinal transected rats still presented sympathetic over activity post LAD ligation.

Conclusion: The sympathetic nervous system is activated immediately after coronary ligation in the rat, being mediated by spinal mechanisms and, later, sustained by angiotensinergic mechanisms and concomitant augmentation of sympathoexcitatory reflexes.

Keywords: Sympathetic nerve activitie; Baroreflex; Chemoreflex; Myocardial Infarction; Cardiopulmonary Reflex

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Diagrama representativo da vasculatura coronária do lado esquerdo, mostrando o ponto exato em que a sutura com um laço falso era colocada ao redor da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE), para posterior realização da ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” (Modificado de Herrmann e colaboradores, 2010). 35
- Figura 2.** Representação esquemática da preparação tronco cerebral-coração isolados (*Working heart brainstem preparation – WHBP*). ECG – eletrocardiograma; FC – frequência cardíaca; ANF – atividade do nervo frênico; ANSt – atividade do nervo simpático torácico; PVE – pressão ventricular esquerda; PP – pressão de perfusão (Modificado de Nalivaiko e colaboradores, 2010). 39
- Figura 3.** Representação esquemática dos protocolos experimentais realizados após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia”. n = número de animais incluídos em cada protocolo. AT1 – receptor de angiotensina tipo 1. 41
- Figura 4.** (A) Traçados representativos de uma preparação *in vitro* representativa, mostrando as atividades originais e integradas (*f*) do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt) durante um período de um minuto de registro; à direita, o registro do ruído elétrico correspondente a cada nervo, coletado ao final de cada experimento. (B) Registro obtido da média da ANSt em cada uma dessas fases relacionadas ao nervo frênico (Ef – expiração final, I – inspiração, PI – pós-inspiração e Em – expiração

média) a partir de um trecho de um minuto do registro (painel A).

Figura 5. Registros representativos de dois ratos mostrando mudanças transientes no eletrocardiograma (ECG) após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE): (A) Extrassístoles e taquicardia ventricular ocorreram pós-ligadura em alguns animais; (B) Bloqueios átrio-ventriculares iniciando logo após ligadura da DAE. Essas mudanças no ECG duraram $34,0 \pm 4,6$ minutos. \int ANSt e ANSt – atividade integrada e original do nervo simpático torácico, respectivamente; \int ANF e ANF – atividade integrada e original do nervo frênico, respectivamente; PP – pressão de perfusão.

49

Figura 6. (A) Fotografia típica mostrando secções transversais medianas de corações marcados com o corante azul de Evans. O corte transversal do coração com ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (à esquerda) tinha uma área marcada em azul (parte viável) versus uma área miocárdica de risco que não absorveu o corante (área pálida, delineada em preto). Em contraste, o coração Sham estava completamente marcado com o corante azul de Evans. (B) Registro mostrando a pressão ventricular esquerda (PVE) antes (Basal) e 1, 30 e 60 minutos após ligadura da DAE. ECG – eletrocardiograma; ANF – atividade do nervo frênico.

50

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos antes (Basal) e minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda *in vitro* (n = 7).

51

Figura 7. (A) Traçado típico da atividade integrada (\int) e original do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt), frequência cardíaca (FC) e pressão de perfusão (PP) antes (Basal) e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE). Médias da ANSt média, PP, FC e frequência de ANF antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da DAE (Ai, Aii, Aiii e Aiv, respectivamente, n = 21). ** P<0,01 comparado ao Basal.

53

Figura 8. (A) Registro típico da atividade integrada (\int) e original do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt), frequência cardíaca

(FC) e pressão de perfusão (PP) antes (Basal) e 60 minutos após “ligadura fictícia” nos animais do grupo Sham. Médias da ANSt média, PP, FC e frequência de ANF antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após Sham (Ai, Aii, Aiii e Aiv, respectivamente, n = 21). ** P<0,01 comparado ao Basal. 54

Figura 9. Respostas quimiorreflexas periféricas a doses de NaCN (0,03 % – 25, 50 and 75 µL, i.a.) 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” no grupo Sham (n = 7 cada grupo). (A) Registros de um rato com ligadura da DAE (Ai) e um rato Sham (Aii), mostrando simpato-excitação para todas as doses testadas. (B) Mudança na resposta simpato-excitatória (** P<0,01 comparado ao Sham). Diferença na magnitude da simpato-excitação entre as doses usadas (# P<0,05 e ### P<0,01). Respostas quimiorreflexas de frequência respiratória (C), pressora (D) e bradicárdica (E) entre os dois grupos. ∫ANSt – atividade integrada do nervo simpático torácico; ∫ANF – atividade integrada do nervo frênico. 56

Figura 10. Respostas reflexas barorreceptoras induzidas pela fenilefrina (30 µg, i.a.) 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (n = 6 cada grupo). (A) e (B) Mudanças na resposta pressora gerada pela fenilefrina e no ganho simpático (** P<0,01 comparado ao Sham). (C) Ganho bradicárdico entre os grupos DAE e Sham. 58

Tabela 2. Mudanças na frequência cardíaca (FC) geradas pelo atenolol e vagotomia bilateral 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” (grupo Sham) *in vitro*. 60

Figura 11. Efeito do losartan (40 µM adicionado ao perfusato) sobre a atividade do nervo simpático torácico (ANSt) à partir de 1 hora até 3 horas após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (grupo Losartan-DAE: n = 10; grupo Salina-DAE: n = 9). * P<0,05 comparado ao grupo Salina-DAE. 62

Figura 12. Atividade do nervo simpático torácico (ANSt) nas preparações

submetidas a transecção da medula espinhal: ANSt média antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (B; n = 5) ou “ligadura fictícia” em ratos Sham (A; n = 5). (C) Porcentagem de mudança na ANSt média nos tempos de 30, 45 e 60 minutos após ligadura da DAE em ratos com transecção espinhal (grupo DAE – Transecção; n = 5, ** P<0,01 comparado ao valor basal do respectivo grupo) e em ratos com medula espinhal intacta (grupo DAE – Intacta; n = 21, ### P<0,01 comparado ao respectivo basal). 64

Figura 13. Frequência cardíaca (FC) média antes (Basal antes da transecção) e após (Basal após transecção) transecção da medula espinhal e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (B; grupo DAE – Transecção, n = 5) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (A; grupo Sham – Transecção, n = 5). ** P<0,01 indica diferença entre FC basal antes e após transecção no grupo Sham; * P<0,05 indica diferença entre FC basal antes e após transecção no grupo DAE; e ### P<0,01 indica diferença entre FC basal após transecção e 60 minutos após “ligadura fictícia” no grupo Sham. 65

Figura 14. Acoplamento entre as atividades simpática e respiratória: Atividade integrada média do nervo simpático torácico (ANSt) em quatro fases do ciclo respiratório (calculada de acordo com o intervalo de tempo entre dois disparos do nervo frênico) – expiração final (Ef), inspiração (I), pós-inspiração (PI) e expiração média (Em) – antes (Basal) e 30 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (A; n = 21) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (B; n = 19). **, ###, &&, †† P<0,01 comparado ao basal do respectivo grupo; a magnitude de aumento nos tempos de 30 e 60 minutos em relação à linha basal está expressa em porcentagem. 67

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| ANF | Atividade do nervo frênico |
| ANSM | Atividade do nervo simpático muscular vasoconstritor |
| ANSR | Atividade do nervo simpático renal |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Cloreto de cálcio dihidratado |
| CO_2 | Dióxido de carbono |
| DAE | Artéria descendente anterior esquerda |
| dP/dt+ | Derivada máxima de pressão do ventrículo esquerdo |
| dP/dt- | Derivada mínima de pressão do ventrículo esquerdo |
| ECG | Eletrocardiograma |
| Ef | Expiração final |
| Em | Expiração média |
| FC | Frequência cardíaca |
| I | Inspiração |
| i.a. | Intra-arterial |
| ICC | Insuficiência cardíaca crônica |
| IM | Infarto do miocárdio |
| KCl | Cloreto de potássio |
| KCN | Cianeto de potássio |
| KH_2PO_4 | Fosfato dihidrogeno potássio |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de magnésio heptahidratado |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaCN | Cianeto de sódio |
| NaHCO_3 | Bicarbonato de sódio |

| | |
|----------------|--|
| NTS | Núcleo do trato solitário |
| O ₂ | Oxigênio |
| PE-10 | Polietileno 10 |
| PI | Pós-inspiração |
| PP | Pressão de perfusão |
| PSVE | Pressão sistólica ventricular esquerda |
| PVE | Pressão ventricular esquerda |
| Receptor AT1 | Receptor de angiotensina tipo 1 |
| RVLM | Bulbo ventro-lateral rostral |
| SRA | Sistema renina-angiotensina II |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 32 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 34 |
| 3.2. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADOS, <i>IN VITRO</i> | 34 |
| 3.2.1. Solução de perfusão | 34 |
| 3.2.2. Procedimentos cirúrgicos e perfusão da preparação <i>in vitro</i> | 34 |
| 3.2.3. Registros de nervos na preparação <i>in vitro</i> | 37 |
| 3.2.4. Ligadura da DAE <i>in vitro</i> e medida da área de risco | 37 |
| 3.2.5. Registro da pressão ventricular esquerda na preparação <i>in vitro</i> .. | 38 |
| 3.2.6. Ativação do quimiorreflexo e barorreflexo <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.2.7. Bloqueio simpático e vagal cardíacos <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.2.8. Bloqueio do SRA <i>in vitro</i> | 40 |
| 3.2.9. Transecção da medula espinhal <i>in vitro</i> | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS | 41 |
| 3.4. ANÁLISE DE DADOS | 43 |
| 3.4.1. Análise da frequência de ANF | 43 |
| 3.4.2. Análise da ANSt | 43 |
| 3.4.3. Análise das respostas quimiorreflexas | 43 |
| 3.4.4. Análise das respostas barorreflexas | 44 |
| 3.4.5. Análise do acoplamento entre as atividades simpática e respiratória | 44 |
| 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 46 |
| 4. RESULTADOS | 48 |
| 4.1. ÁREA DE RISCO, MUDANÇAS ELETROCARDIOGRÁFICAS E HEMODINÂMICAS APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA <i>IN VITRO</i> | 48 |
| 4.2. PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS E ANSt | 52 |
| 4.3. REFLEXO QUIMIORRECEPTOR PERIFÉRICO | 55 |
| 4.4. REFLEXO BARORRECEPTOR | 57 |
| 4.5. TONOS SIMPÁTICO E VAGAL CARDÍACOS | 59 |
| 4.6. MECANISMOS MEDIANDO SIMPATO-EXCITAÇÃO APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA | 61 |
| 4.6.1. Angiotensina II | 61 |
| 4.6.2. Transecção da medula espinhal | 63 |
| 4.7. ACOPLAMENTO ENTRE AS ATIVIDADES SIMPÁTICA E RESPIRATÓRIA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA | 66 |
| 5. DISCUSSÃO | 69 |
| 5.1. CURSO TEMPORAL DO DESBALANÇO AUTONÔMICO APÓS | 70 |

| | |
|---|------------|
| LIGADURA DA CORONÁRIA | |
| 5.2. RESPOSTAS SIMPÁTICAS BARORREFLEXA E QUIMIORREFLEXA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA | 73 |
| 5.3. TONO VAGAL CARDÍACO E SUA ATIVAÇÃO REFLEXA | 75 |
| 5.4. MECANISMOS INICIANDO A ATIVAÇÃO SIMPÁTICA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA | 77 |
| 5.5. RELEVÂNCIA FUNCIONAL DA ATIVAÇÃO SIMPÁTICA IMEDIATA APÓS-IM | 81 |
| 6. CONCLUSÕES | 83 |
| 7. REFERÊNCIAS | 85 |
| 8. ANEXO (artigo publicado relacionado à tese) | 100 |

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de óbitos em todo o mundo. Segundo previsão da Organização Mundial de Saúde, a doença coronária é e continuará a ser a principal causa de mortalidade no planeta (Lopez & Murray, 1998). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por um terço dos óbitos com elevada proporção de casos na faixa dos 45 aos 64 anos (Lotufo, 1998). Apesar de englobar um conjunto de doenças consideradas como próprias da faixa etária idosa, em cidades como São Paulo, as doenças cardiovasculares respondem pela maior parte de anos produtivos de vida perdidos, a despeito do aumento do número de mortes entre os jovens do sexo masculino por causas externas (Marcopito & Berlin, 1998). Dentre as doenças cardiovasculares, a doença isquêmica do coração, incluindo o infarto do miocárdio (IM), é o componente principal dessa mortalidade nas cidades da Região Sul e Sudeste do país (de Lolio, *et al.*, 1995).

O IM ocorre quando o suprimento sanguíneo para uma parte do músculo cardíaco é severamente reduzido ou bloqueado, trazendo consequências desastrosas com comprometimentos graves da função cardíaca e redução da expectativa de vida dos indivíduos. A morte súbita é a principal complicação do IM (Zheng, *et al.*, 2001). As arritmias ventriculares são responsáveis pela maior parte das mortes súbitas (Henkel, *et al.*, 2006), sendo que a degeneração em fibrilação ventricular está associada com baixa sobrevivência nos primeiros trinta dias após o IM (Al-Khatib, *et al.*, 2003). Desta mesma forma, foi demonstrado que as arritmias ventriculares estão associadas à morte súbita nos seis primeiros meses que se seguem ao IM (Maggioni, *et al.*, 1993). Estudo realizado por Gaudron e colaboradores (2001), em pacientes infartados, mostrou que aqueles com remodelamento ventricular mais acentuado têm maior propensão à morte súbita.

O remodelamento cardíaco que se segue ao IM constitui um conjunto de alterações estruturais, bioquímicas e eletrofisiológicas que ocorrem tanto na região do infarto como no miocárdio que sobrevive à agressão isquêmica. Algumas das alterações presentes no remodelamento teriam uma finalidade compensatória, incluindo a hipertrofia do miocárdio remanescente. Essas alterações, entretanto, são usualmente incapazes de restaurar a função ventricular (Mill, *et al.*, 1990). Ao contrário, a longo prazo, levam a deterioração da função mecânica da bomba cardíaca e facilitam o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. O remodelamento

determina profundas mudanças na estabilidade elétrica e mecânica do coração, em decorrência das modificações da excitabilidade celular nas áreas diretamente afetadas pela isquemia, como também um desbalanceamento do tono autonômico dirigido para o coração (Corr & Gillis, 1975), que inclui aumento da atividade simpática e modificações do tono vagal. O desbalanço vagal parece depender da localização da isquemia. Após isquemia e infarto da parede inferior do ventrículo esquerdo, ativação vagal reflexa tem sido relatada (Webb, *et al.*, 1972, Thames, *et al.*, 1978). Essa resposta reflexa parece ser secundária à ativação de terminais nervosos sensíveis à distensão, cuja maior densidade reside justamente na parede inferior do ventrículo esquerdo (Thoren, 1976, Thames, *et al.*, 1978, Iwamura & Bishop, 1980). Em relação aos infartos de parede anterior e lateral, os dados da literatura são controversos. Cerati & Schwartz (1991) e Schwartz e colaboradores (1988) relataram que a ligadura da artéria descendente anterior em cães aumenta a atividade das fibras vagais que se dirigem para o coração. Nos animais com atividade vagal aumentada foi menor a incidência de fibrilação ventricular e maior a sobrevida. Em contrapartida, estudos realizados na fase crônica do infarto ântero-lateral evidenciaram menor variabilidade de frequência cardíaca e diminuição da sensibilidade do barorreflexo (Hull, *et al.*, 1990), os quais sugerem perda do controle vagal sobre a frequência cardíaca (FC) (Kleiger, *et al.*, 1987).

Por outro lado, evidência de hiperatividade do sistema nervoso simpático é bem estabelecida nos pacientes após IM (McAlpine & Cobbe, 1988, Sigurdsson, *et al.*, 1993, Lombardi, *et al.*, 1996, Graham, *et al.*, 2002). Inicialmente, a elevação da atividade simpática tem importância por prover suporte inotrópico ao coração, mantendo débito cardíaco e pressão arterial após IM. Entretanto, a ativação simpática também está relacionada à patogênese de arritmias ventriculares (Pantridge, *et al.*, 1981, Jardine, *et al.*, 2007, Floras, 2009) e morte súbita (Brunner-La Rocca, *et al.*, 2001). Além disso, a simpato-excitação sustentada, a longo prazo, pode contribuir para o remodelamento cardíaco progressivo e desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Cohn, *et al.*, 1984, Kaye, *et al.*, 1995, Bristow, 2003), e, conseqüentemente, elevando os índices de morbidade e mortalidade pós-infarto. Um estudo em pacientes mostra que 50 % das mortes ocorrem durante a fase aguda do IM (nos primeiros 60 minutos) (Lowel, *et al.*, 1993), sendo essas mortes implicadas com a ocorrência de arritmias ventriculares letais. Levando em

consideração que os eventos cardíacos arrítmicos são frequentemente precedidos por sinais de hiperatividade simpática (Pantridge, *et al.*, 1981), o conhecimento sobre o curso temporal, o grau de ativação e os mecanismos envolvidos nas mudanças simpáticas é de grande importância para melhorar futuras estratégias de tratamento; por exemplo, o momento apropriado da medicação para antagonizar os efeitos simpáticos na vasculatura e no coração pode ser essencial para manter pressão arterial e prevenir arritmias cardíacas e morte súbita cardíaca.

O sistema nervoso simpático é parte do sistema nervoso autonômico e diz respeito à inervação visceral, consiste em alças aferentes e eferentes. As fibras aferentes se projetam geralmente em direção ao sistema nervoso central por meio dos nervos autonômicos, enquanto os impulsos eferentes caminham do sistema nervoso central para os diferentes órgãos por meio de nervos autonômicos ou somáticos. Os neurônios eferentes simpáticos estão localizados no cérebro e na medula espinhal. Os corpos desses neurônios se encontram nos cornos laterais de segmentos espinhais de T1 a L2. As fibras pré-ganglionares mielinizadas caminham em direção aos gânglios do sistema do sistema nervoso simpático, os quais são organizados principalmente em duas cadeias paravertebrais que se localizam anterolateralmente aos corpos vertebrais e se estendem da região cervical à região sacral. Essas são chamadas cadeias ganglionares simpáticas. As fibras pré-ganglionares fazem sinapse nas cadeias simpáticas com fibras pós-ganglionares não mielinizadas, as quais caminham pelos nervos espinhais em direção ao órgão efector. O neurotransmissor na sinapse pré-ganglionar é a acetilcolina, enquanto a norepinefrina é o principal transmissor nas sinapses formadas pelos nervos simpáticos pós-ganglionares e órgãos efetores. O sistema nervoso simpático capacita o corpo a enfrentar situações de medo, fuga e luta. Dentre os efeitos gerados pela ativação simpática estão incluídos o aumento da FC, pressão arterial e débito cardíaco, desvio do fluxo sanguíneo da pele e vasos esplâncnicos para aqueles que abastecem os músculos esqueléticos, aumento do tamanho da pupila, dilatação bronquiolar, contração de esfíncteres e mudanças metabólicas, como a mobilização de gordura e degradação de glicogênio. (Ciarka, *et al.*, 2008)

O funcionamento do sistema nervoso simpático é principalmente baseado no arco reflexo. As principais respostas reflexas se originam de barorreceptores aórticos e carotídeos e de quimiorreceptores centrais e periféricos (Ciarka, *et al.*, 2008). Os

barorreceptores são sensíveis às alterações de tensão produzida na parede dos vasos pelas ondas de pressão sistólica ou por elevações súbitas da pressão arterial (Persson, 1991). A ativação destes receptores gera potenciais de ação, os quais são transmitidos ao sistema nervoso central pelas aferências que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando há um aumento súbito da pressão arterial, a ativação barorreflexa promove simultaneamente uma elevação da atividade parassimpática para o coração e uma diminuição da atividade simpática tanto para os vasos de resistência quanto para o coração (Spyer, 1990). Isto resulta em bradicardia, redução da força de contração cardíaca, redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da pressão arterial. Em contrapartida, a queda da pressão arterial é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações opostas às acima descritas para os componentes autonômicos. Dessa forma, os barorreceptores afetam o desempenho cardíaco por meio de três diferentes vias: vias simpática e parassimpática diretas dirigidas ao miocárdio atrial e ventricular e marca-passo cardíaco, e através da via que afeta a resistência arterial e a capacitância venosa, com conseqüentes mudanças na pré- e pós-carga. Os quimiorreceptores centrais estão localizados no tronco cerebral e aumentam o débito inspiratório em resposta ao aumento na pressão parcial de dióxido de carbono no sangue. São também sensíveis às mudanças do pH sanguíneo. Já as respostas reflexas oriundas da ativação dos quimiorreceptores periféricos são os principais mecanismos defensivos perante hipóxia. Em resposta à diminuição da saturação de oxigênio arterial, o quimiorreflexo promove ativação do sistema nervoso simpático e vasoconstrição na maioria dos órgãos, com exceção do cérebro e coração (Ciarka, *et al.*, 2008).

Anormalidades no controle reflexo do sistema nervoso simpático envolvendo tanto os barorreceptores quanto os quimiorreceptores vêm sendo demonstradas no estado de insuficiência cardíaca. Experimentos em humanos e animais vêm mostrando claramente que a insuficiência cardíaca crônica (ICC) se acompanha de depressão da sensibilidade barorreflexa arterial (Eckberg, *et al.*, 1971, Ferguson, *et al.*, 1992, Zucker *et al.*, 1993, Zucker, *et al.*, 1995). De fato, tem sido bem aceito que a função barorreflexa deprimida pode ser uma das causas da simpato-excitação na ICC (Mancia, 1990). Do mesmo modo, o aumento de reflexos simpato-excitatórios

mediando mudanças no fluxo simpático após IM e em condição mais avançada de ICC tem sido também investigado. Vários grupos têm demonstrado claramente que a atividade quimiorreflexa central e periférica está elevada em pacientes com insuficiência cardíaca (Chugh, *et al.*, 1996, Chua & Coats, 1997, Narkiewicz, *et al.*, 1998, Narkiewicz, *et al.*, 1999, Kara *et al.*, 2003). Experimentos de Sun e colaboradores (1999a), em coelhos com ICC induzida por estimulação crônica de alta frequência com marca-passo, mostraram que as respostas ventilatórias e simpáticas à hipóxia estavam aumentadas, enquanto que as respostas à hipercapnia normóxica estavam normais. Além disso, foi demonstrado que a descarga aferente das terminações sensoriais no corpúsculo carotídeo estava também aumentada para qualquer nível de pressão parcial de oxigênio (Sun, *et al.*, 1999b).

Outro reflexo simpato-excitatório que tem sido implicado na gênese da atividade simpática na ICC é o reflexo cárdio-cardíaco simpático espinhal. Esse reflexo tem sido bem descrito por Malliani & Montano (2002), emana de fibras de pequeno diâmetro no miocárdio, as quais percorrem nervos simpáticos (Malliani, 1982). Essas fibras são ativadas por uma variedade de substâncias tanto endógenas quanto exógenas (Uchida & Murao, 1975, Felder & Thames, 1982, Nerdrum, *et al.*, 1986, Bolser, *et al.*, 1989, Blair, *et al.*, 1992, Dibner-Dunlap, *et al.*, 1993) e são provavelmente os mesmos aferentes que transmitem a dor cardíaca durante isquemia coronária (Foreman, 1999). Muitas das substâncias que estimulam essas terminações aferentes encontram-se aumentadas tanto no plasma quanto no tecido miocárdico, incluindo bradicinina, prostaglandinas, potássio e lactato (Uchida & Murao, 1974a, Uchida & Murao, 1974b, Uchida & Murao, 1975, Dibner-Dunlap, *et al.*, 1993).

As alterações observadas no tono simpático basal e na atividade reflexa cardiovascular após IM e insuficiência cardíaca parecem também envolver modulação hormonal, incluindo o sistema renina-angiotensina II (SRA). Certamente, esse sistema tem sido um importante alvo terapêutico no manejo de pacientes com ICC (The SOLVD Investigators, 1991, Dietz, *et al.*, 1993, Dickstein, 2001), através do uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina e de bloqueadores de receptores de angiotensina II. Um grande número de trabalhos tem considerado a angiotensina II um importante modulador da função simpática no sistema nervoso

central (Reid, 1992, Brooks & Osborn, 1995, Brooks, 1997). Evidência mostra um aumento na concentração de angiotensina II no fluido cerebrospinal de cães com ICC induzida por estimulação crônica de alta frequência com marca-passo (Wang & Ma, 2000). Modulação reflexa pela angiotensina II foi demonstrada quando o antagonista de receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), losartan, restaurou a função barorreflexa arterial em coelhos com ICC induzida por estimulação do marca-passo (Murakami, *et al.*, 1996). Dados similares foram apresentados por DiBona e colaboradores (1995) em ratos com ICC pela administração central de losartan. A área postrema é uma importante região bulbar que tem sido mostrada modular o fluxo simpático e função barorreflexa por um mecanismo envolvendo angiotensina II (Bishop & Sanderford, 2000). Outras áreas de controle autonômico cardiovascular também estão envolvidas na mediação de mecanismos angiotensinérgicos na ICC. Supra-regulação da expressão de receptores AT1 foi demonstrada no núcleo do trato solitário (NTS), no órgão subfornical e no núcleo paraventricular após ICC em ratos (Yoshimura, *et al.*, 2000), e no bulbo ventro-lateral rostral (RVLM) de coelhos após ICC induzida com marca-passo (Liu, *et al.*, 2006). Liu e colaboradores (2006) também demonstraram que a infusão intracerebroventricular de losartan atenuou a supra-regulação dos receptores AT1 no RVLM de coelhos com ICC. Investigações adicionais mostram modulação do tono basal. O bloqueio central de receptores AT1, além de aumentar a sensibilidade barorreflexa, reduziu a atividade simpática em coelhos com ICC (Murakami, *et al.*, 1997, Liu & Zucker, 1999). E em ratos Wistar, a infusão intracerebroventricular ou a administração sistêmica de losartan reduziram a hiperatividade simpática e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) na insuficiência cardíaca induzida por ligadura da artéria coronária (Huang, *et al.*, 2009).

Todos esses achados mostram que a regulação da atividade simpática após IM e insuficiência cardíaca é um processo complexo e multifatorial. Contudo, a importância e a sequência de alterações desses e de outros mecanismos de regulação simpática tônica e reflexa, bem como o curso temporal dessas mudanças imediatamente após IM, ainda não têm sido caracterizados. Esse conhecimento contribuiria para a melhoria de futuras intervenções terapêuticas após IM, evitando o desenvolvimento da insuficiência cardíaca e, em geral, melhorando as taxas de mortalidade.

Na busca dessas informações, várias abordagens metodológicas vêm sendo realizadas. O perfil temporal do desbalanço autonômico vem sendo obtido no período de horas ou dias após IM ou posteriormente no curso da insuficiência cardíaca com a utilização de índices/medidas indiretas. Dentre esses índices/medidas estão incluídos os níveis de catecolaminas plasmáticas (McAlpine & Cobbe, 1988), a variabilidade da frequência cardíaca e a sensibilidade barorreflexa (La Rovere, *et al.*, 1998). A elevação dos níveis de catecolaminas plasmáticas após IM se normaliza em dias (Sigurdsson, *et al.*, 1993), enquanto que a variabilidade da frequência cardíaca e a sensibilidade barorreflexa levam meses para recuperar os valores basais (Schwartz, *et al.*, 1988, Bigger, *et al.*, 1991). Essas observações geram maior interesse em estudos que usam medidas diretas para investigar melhor a ativação do sistema nervoso simpático. A microneurografia é um método direto que vem sendo realizado em pacientes após IM. Em 2002, foi demonstrado pela primeira vez que pacientes após IM, e com fração de ejeção ventricular esquerda > 40 %, apresentavam atividade aumentada em nervos simpáticos de músculo esquelético, a qual era medida por microneurografia poucos dias após IM, sendo esse aumento de atividade persistente por, pelo menos, 6 meses (Graham, *et al.*, 2002). Estudo adicional em pacientes mostrou que a hiperatividade simpática precisa de um período de 9 meses para alcançar função do sistema nervoso simpático normalizada (Graham, *et al.*, 2004). Apesar dessa evolução nas técnicas empregadas em pacientes, estudos em animais experimentais são ainda indispensáveis na determinação do início das alterações autonômicas; uma vez que os infartos são imprevisíveis e, desta forma, a maioria dos pacientes chega à unidade clínica após a ocorrência do evento.

Sendo assim, a realização de medidas diretas da atividade de nervos simpáticos em animais experimentais seria interessante para avaliar alterações imediatas do fluxo simpático após IM. A ligadura da artéria coronária vem sendo muito utilizada para mimetizar o IM em ratos (Clark, *et al.*, 1980, Mill, *et al.*, 1990). No presente trabalho, a ligadura coronariana foi feita numa preparação de tronco cerebral-coração perfundida *in vitro*. Essa preparação foi desenvolvida por Paton (1996) e é uma ferramenta experimental adequada para a investigação do curso temporal das alterações de funções autonômicas após IM:

(i) É livre dos efeitos depressores dos anestésicos;

(ii) Os centros cardiomotores no tronco cerebral estão completamente funcionais e com as conexões neurais preservadas entre esses centros e o coração. Sendo assim, os reflexos cardiovasculares, tais como o barorreflexo e o quimiorreflexo, estão preservados;

(iii) Permite a avaliação simultânea de vários parâmetros cárdio-respiratórios por meio do registro da atividade eferente de nervos, tais como o nervo frênico e o nervo simpático torácico, exibindo padrões de atividade similares àqueles observados em modelos experimentais *in vivo*.

A hipótese do presente estudo foi a de que o sistema nervoso simpático estaria imediatamente supra-regulado após ligadura da artéria descendente anterior esquerda (DAE) na preparação tronco cerebral-coração isolados em ratos, sem alterações no controle vagal. A iniciação e sustentação da hiperatividade simpática gerada após ligadura da coronária envolveria a mediação de diferentes mecanismos tempo-dependentes.

2. OBJETIVOS

Diante das informações expostas anteriormente, os objetivos do presente trabalho foram:

OBJETIVO GERAL

Investigar o curso temporal e os mecanismos de ativação do sistema nervoso simpático logo após a ligadura da artéria coronária na preparação tronco cerebral-coração isolados em ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as mudanças imediatas (durante os primeiros 60 minutos) geradas pela ligadura da artéria descendente anterior esquerda (DAE) sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e a atividade simpática.
- Avaliar o quimiorreflexo 60 minutos após ligadura da DAE.
- Avaliar o barorreflexo 60 minutos após ligadura da DAE.
- Avaliar o tono simpático cardíaco e o tono vagal 60 minutos após ligadura da DAE.
- Investigar mecanismos mediadores de mudanças autonômicas iniciais promovidas pela ligadura da DAE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Ratos Wistar (60 – 100 g), provenientes da Unidade de Serviço Animal (*Animal Services Unit – ASU*) da Universidade de Bristol no Reino Unido (*University of Bristol/UK*), foram utilizados para obtenção da preparação tronco cerebral-coração isolados (*Working heart brainstem preparation – WHBP*), descrita por Paton (1996). Todos os procedimentos experimentais e cirúrgicos foram conduzidos de acordo com a Lei de 1986 sobre Procedimentos Científicos em Animais do Reino Unido [*The United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act 1986*] e foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Bristol (*The University of Bristol Animal Ethics Committee; Permit number PPL 30/3121*).

3.2. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADOS, *IN VITRO*

3.2.1. Solução de perfusão

A solução de perfusão era preparada em água deionizada e composta por:

- 1,25 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Chemical);
- 1,25 mM de KH_2PO_4 (Fisher Scientific);
- 3,0 mM de KCl (Fisher Scientific);
- 25,0 mM de NaHCO_3 (Fisher Chemical);
- 125,0 mM de NaCl (Fisher Chemical);
- 2,5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Chemical);
- 10 mM de D-glucose (Fisher Chemical);
- e 1,25 % de Ficoll 70 (agente oncótico; Sigma).

3.2.2. Procedimentos cirúrgicos e perfusão da preparação *in vitro*

Inicialmente, os ratos eram pré-tratados com heparina sódica (1000 unidades/animal, i.p.; Wockhardt), 10-20 minutos antes da anestesia, a fim de se evitar a formação de coágulos que pudessem obstruir o sistema de perfusão, e, em seguida, eram anestesiados profundamente com isoflurano (5 %, vaporizado em 95 % O_2 – 5 % CO_2 ; Sigma), até a perda do reflexo de retirada da pata. Após transecção sub-diafragmática, os ratos eram exsanguinados e a anestesia

suspensa. A preparação (cabeça e tórax) era, então, imersa em solução de perfusão (sem agente oncótico; veja acima) resfriada a 2 – 4 °C, seguida de remoção da pele (para evitar que os pelos contaminassem e obstruíssem o sistema de perfusão) e a decerebração pré-colicular. Em seguida, a aorta descendente foi isolada para posterior canulação e parte das costelas foi removida para permitir melhor acesso ao coração e nervos. Os pulmões foram removidos e o nervo frênico isolado, cortando-o na junção com o diafragma.

Um fio de sutura prolene 6/0 (Ethicon) era passado ao redor da artéria descendente anterior esquerda (DAE) e um laço falso era feito. Nas preparações em que eram feitas a ligadura coronariana, o nó era firmemente apertado, obstruindo o fluxo distalmente ao sítio da ligadura. Nas preparações controle (Sham), o nó não era apertado mantendo-se fluxo normal ao longo do vaso coronariano (“ligadura fictícia”) (Figura 1).

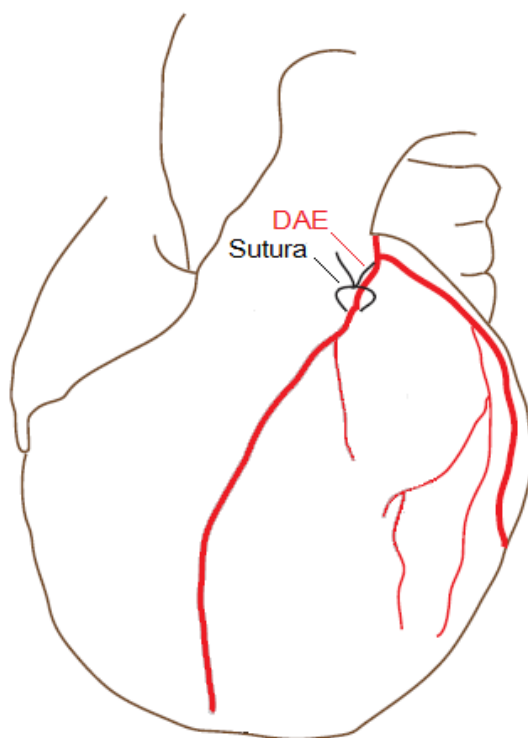


Figura 1. Diagrama representativo da vasculatura coronária do lado esquerdo, mostrando o ponto exato em que a sutura com um laço falso era colocada ao redor da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE), para posterior realização da ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” (Modificado de Herrmann e colaboradores, 2010).

Após esses procedimentos, a preparação era transferida para o sistema de perfusão/registo. Esse sistema era composto, em geral, por (Figura 2):

I: Câmara acrílica – serve como suporte da preparação, para realizar a perfusão e registros, e permite a coleta do perfusato extravasado do animal durante a perfusão, para recirculação.

II: Bomba peristáltica (Watson-Marlow 502S) – garantia a circulação/recirculação do perfusato, com um fluxo constante;

III: Tubos de entrega do perfusato (Tygon Cole Palmer, EUA: ID 1,56 mm e OD 4,7 mm), relativamente impermeáveis a O_2 e CO_2 – permitiam a entrega do perfusato à preparação;

IV: Trocador de calor – permitia o aquecimento do perfusato;

V: “Armadilha de bolhas” – retirava eventuais bolhas presentes no perfusato, antes de sua entrega à preparação;

VI: Filtro, com membrana de polietileno (Millipore, PP25) – filtrava possíveis resíduos biológicos (sangue, tecido, etc) presentes no perfusato, antes de sua entrega à preparação;

VII: Cateter de duplo lúmen (Portex, MA, EUA: DI 0,28 mm e DE 0,61 mm) – uma via permitia a perfusão e a outra o registro da pressão de perfusão (PP);

VIII: Tubos de coleta do perfusato (Tygon Cole Palmer, EUA: ID 1,56 mm e OD 4,7 mm), relativamente impermeáveis a O_2 e CO_2 – conectados a orifícios na câmara acrílica, permitiam a contínua recirculação da solução.

O tecido anteriormente dissecado era, então, colocado sobre a câmara acrílica (I) e o cateter de duplo lúmen (VII) era inserido na aorta descendente, para realizar a perfusão retrógrada através dos tubos de entrega (III), com o auxílio da bomba peristáltica (II). O segundo lúmen do cateter era usado para monitorar a PP, por meio de um transdutor de pressão. O perfusato (descrito no item 3.2.1) era continuamente aerado com 95 % de O_2 e 5 % de CO_2 , mantendo o pH igual a 7,4, e aquecido a 31 °C utilizando o trocador de calor (IV). Antes de alcançar o animal, o perfusato ainda passava pela “armadilha de bolhas” (V) e por filtragem (VI).

O bloqueio neuromuscular era feito com brometo de vecurônio (2 mg/mL; Organon), para evitar que movimentos perturbassem os registros. A PP média era mantida > 60 mmHg, ajustando-se o fluxo para 20 – 22 mL/min e adicionando o agente vasoconstritor arginina vasopressina (20 – 60 µL a 5 µM; Sigma) ao perfusato. Os sinais do eletrocardiograma (ECG) foram adquiridos por meio de três agulhas fixadas nas patas dianteiras e no ponto mais distal da preparação, conectadas a cabos de um pré-amplificador. A FC foi derivada do registro do ECG, por meio do intervalo R-R.

3.2.3. Registros de nervos na preparação *in vitro*

As atividades dos nervos frênico (ANF) e simpático torácico (ANSt; região T8 – T10) foram registradas simultaneamente, utilizando eletrodos de sucção de vidro conectados a micromanipuladores (Narishige, Tóquio, Japão). Alguns minutos após o início da perfusão, o registro da atividade em rampa do nervo frênico era obtido (Figura 2), indicando um padrão eupneico e servindo, assim, como índice fisiológico da viabilidade da preparação. Todos os sinais foram amplificados, filtrados (0,5 - 5 kHz), adquiridos usando o conversor A/D CED 1401 (Cambridge Electronic Design) e analisados usando o software Spike2 (Cambridge Electronic Design).

3.2.4. Ligadura da DAE *in vitro* e medida da área de risco

Após a realização dos registros basais de ANF, ANSt, FC, ECG e PP, a ligadura da DAE era realizada cuidadosamente, a fim de não causar perturbações nos registros dos nervos; a sutura era mantida não laçada (“ligadura fictícia”) nas preparações Sham.

No final de cada experimento, o coração era rapidamente removido e perfundido via a aorta ascendente com o corante azul de Evans (solução aquosa a 1 %; Sigma), para marcação da área miocárdica de risco, como descrito previamente (Huang, *et al.*, 1999, Huang, *et al.*, 2004). A solução de azul de Evans era perfundida durante um período de um minuto, por meio de uma bomba de perfusão. Assim que a perfusão era completada, os átrios eram removidos e, após fixação em formalina 10 % (por aproximadamente 24 h), os ventrículos eram seccionados em cinco fatias transversas. As fatias eram então fotografadas digitalmente e analisadas usando o software ImageJ (versão 1.33u). A área miocárdica de risco foi determinada como

porcentagem da área não marcada com azul de Evans relativa à área total do ventrículo esquerdo. Em todos os ratos Sham com “ligadura fictícia”, nenhuma área de risco foi observada.

3.2.5. Registro da pressão ventricular esquerda na preparação *in vitro*

A pressão ventricular esquerda (PVE) foi registrada usando uma cânula de polietileno (PE-10), inserida dentro do ventrículo esquerdo através do ápice do coração (Figura 2). A cânula PE-10 era, então, conectada ao transdutor de pressão. Os seguintes parâmetros eram coletados: pressão sistólica ventricular esquerda (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), derivada máxima de pressão ($dP/dt+$) e derivada mínima de pressão ($dP/dt-$) do ventrículo esquerdo. O registro era adquirido usando o conversor A/D CED 1401 (Cambridge Electronic Design) com seu software Spike2 (Cambridge Electronic Design). Após conversão do arquivo de dados para um formato txt, este era aberto por meio do software LabChart 7 (ADInstruments), permitindo uma rápida e fácil coleta dos parâmetros acima descritos.

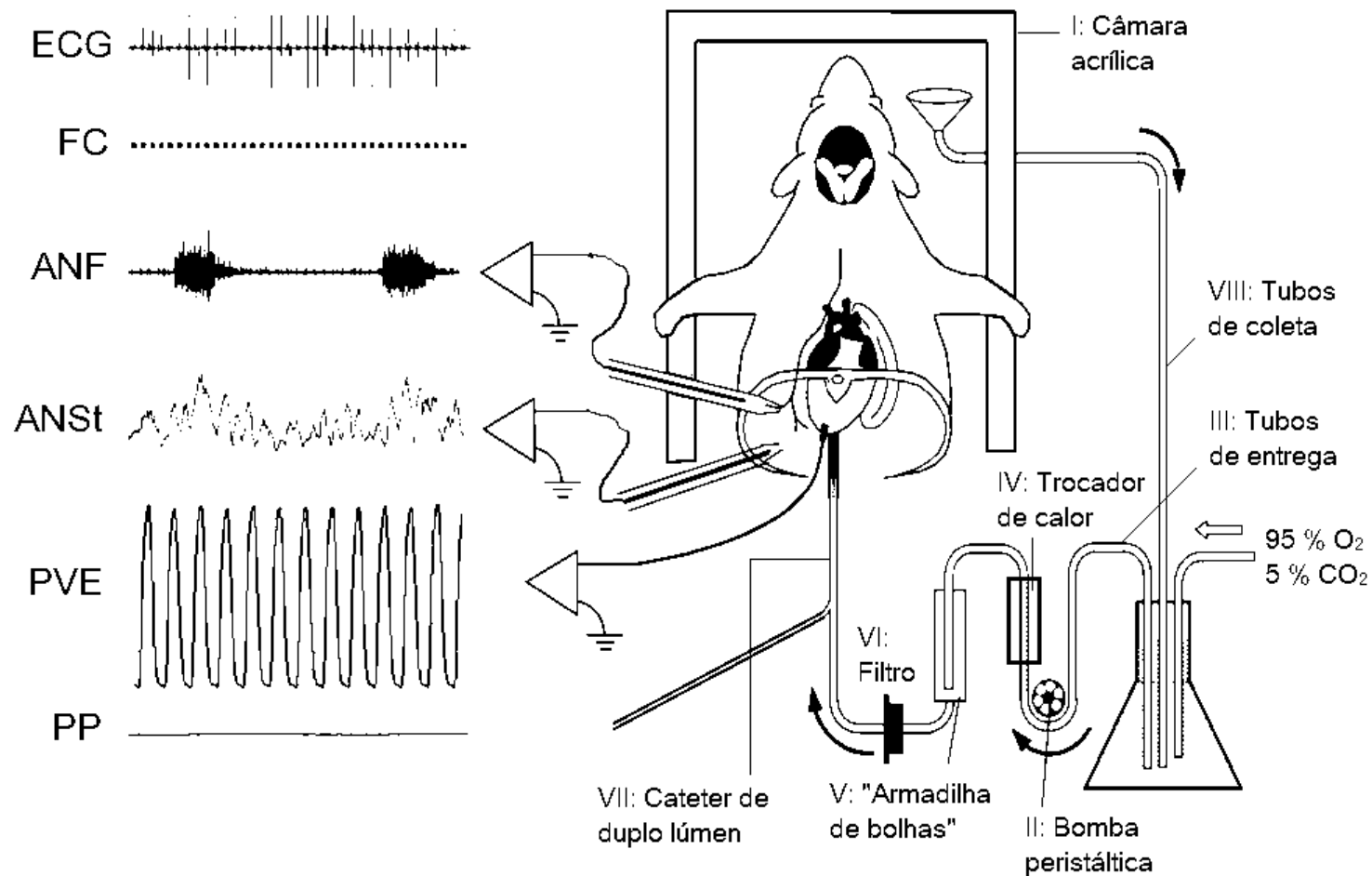


Figura 2. Representação esquemática da preparação tronco cerebral-coração isolados (*Working heart brainstem preparation – WHBP*). ECG – eletrocardiograma; FC – frequência cardíaca; ANF – atividade do nervo frênico; ANSt – atividade do nervo simpático torácico; PVE – pressão ventricular esquerda; PP – pressão de perfusão (Modificado de Nalivaiko e colaboradores, 2010).

3.2.6. Ativação do quimiorreflexo e barorreflexo *in vitro*

Os quimiorreceptores periféricos e os barorreceptores foram estimulados na preparação por meio de administração intra-arterial (i.a.) de drogas. Para a ativação quimiorreflexa, foram utilizadas diferentes doses de cianeto de sódio (NaCN, solução a 0,03%: 25, 50 e 75 μ L; Laboratory BDH – The British Drug Houses LTD – Reagent). Para ativar o barorreflexo, o agente vasoconstritor escolhido foi a fenilefrina (30 μ g *bolus*; Sigma).

Uma seringa era acoplada ao sistema de perfusão da preparação, próxima ao cateter inserido na aorta abdominal, permitindo a administração i.a. das drogas.

3.2.7. Bloqueio simpático e vagal cardíacos *in vitro*

O antagonista β -adrenérgico, atenolol (20 μ g/mL; Sigma) foi utilizado para promover o bloqueio simpático cardíaco na preparação. A adição da droga foi feita diretamente à solução de perfusão.

O bloqueio vagal cardíaco foi promovido por meio da vagotomia bilateral. Para isso, os nervos vagos cervicais eram isolados e identificados com uma linha de sutura 6.0 passada ao redor dos nervos durante a realização do procedimento cirúrgico (descritos no item 3.2.2). Posteriormente, isso facilitava a identificação e seccionamento dos nervos sem causar interferência nos registros.

3.2.8. Bloqueio do SRA *in vitro*

O antagonista de receptor de angiotensina tipo 1 (AT1), losartan potássio (40 μ M; Sigma), foi usado para bloquear sistemicamente o SRA na preparação, sendo adicionado diretamente à solução de perfusão em recirculação.

3.2.9. Transecção da medula espinhal *in vitro*

Adicionalmente aos procedimentos cirúrgicos da preparação (descritos no item 3.2.2), a medula espinhal era exposta ao nível cervical C1, para posterior realização da transecção da medula espinhal durante os registros.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Nosso objetivo inicial era observar as mudanças no tono autonômico cardiovascular e respiratório e seu controle reflexo imediatamente após ligadura da DAE. Para esta etapa da pesquisa, foram utilizados 76 animais para realização de sete protocolos experimentais (Figura 3).

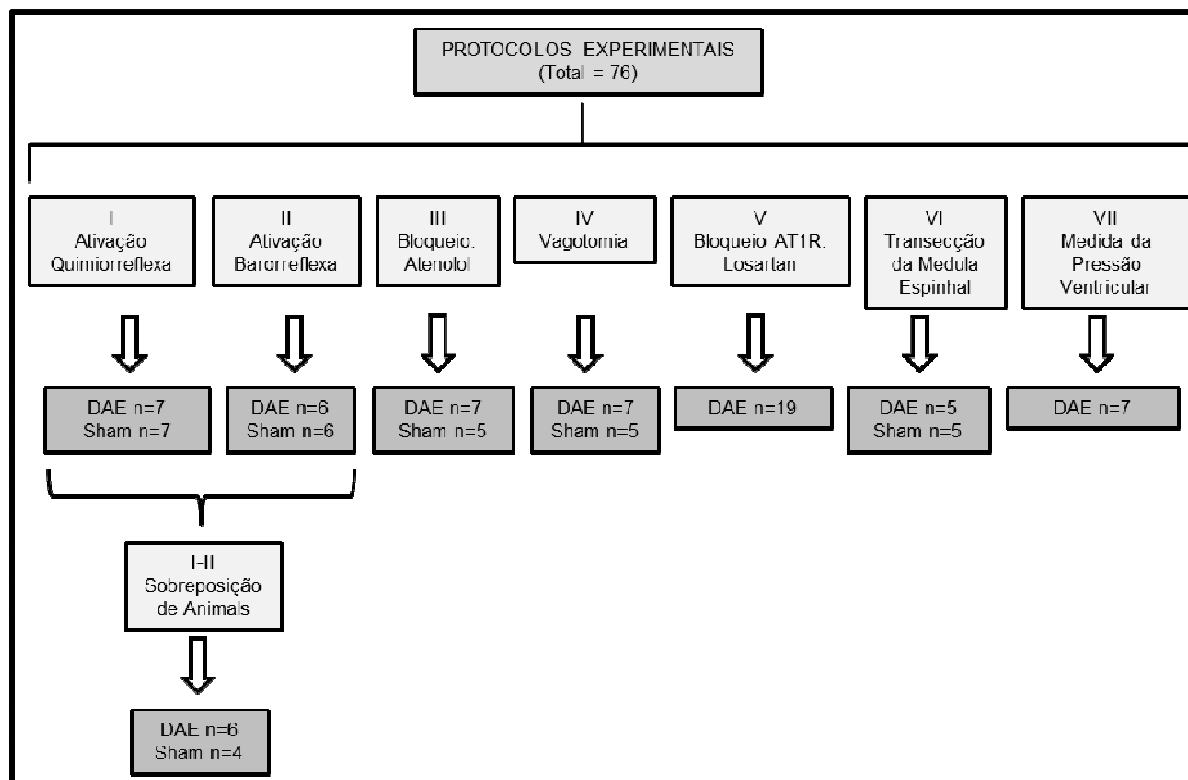


Figura 3. Representação esquemática dos protocolos experimentais realizados após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia”. n = número de animais incluídos em cada protocolo. AT1 – receptor de angiotensina tipo 1.

Dentre esses, seis protocolos foram feitos 60 minutos após ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” no grupo Sham (n = 69):

(I) Os quimiorreceptores periféricos eram estimulados com uso de três doses crescentes de NaCN a 0,03 %: 25, 50 and 75µL *bolus*, i.a.; sendo as injeções separadas por intervalos de 10 minutos.

(II) O reflexo barorreceptor era estimulado usando fenilefrina (30 μg *bolus*, i.a.).

(III) O tono simpático cardíaco era avaliado pela redução da FC obtida após a adição de atenolol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao perfusato.

(IV) O tono vagal cardíaco era avaliado pelo aumento da FC após a vagotomia bilateral.

Os protocolos experimentais V e VI, descritos abaixo, foram realizados a fim de investigar possíveis mecanismos mediadores de mudanças autonômicas iniciais promovidas pela ligadura da DAE:

(V) O losartan potássio, antagonista de receptor AT1, foi usado para avaliar o papel de receptores AT1 na iniciação e manutenção da atividade simpática após ligadura da DAE. Nesse protocolo, losartan (40 μM ; grupo DAE-Losartan, $n = 10$) ou salina (grupo DAE-Salina, $n = 9$) era adicionado ao perfusato 1 hora, e reaplicado 2 horas, após ligadura da DAE e a ANSt era continuamente registrada até 3 horas pós-ligadura.

(VI) Neste protocolo, a transecção da medula espinhal ao nível de C1 era realizada antes do procedimento de ligadura da DAE. A ANSt remanescente, pós-transecção, foi mensurada por 15-20 minutos antes da ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” (grupo Sham) e por 60 minutos após esses procedimentos no grupo DAE ($n = 5$) ou grupo Sham ($n = 5$). O objetivo deste protocolo consistia em avaliar a contribuição de reflexos espinhais na geração da atividade simpática.

Em um sétimo grupo (protocolo VII), a PVE era registrada antes e por 60 minutos após ligadura da DAE ($n = 7$).

Nos primeiros quatro protocolos experimentais (grupo DAE: $n = 21$, e grupo Sham: $n = 19$, parâmetros cardiorrespiratórios e a ANSt foram avaliados antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” no grupo Sham. Além disso, a modulação da atividade respiratória-simpática (por meio da análise do acoplamento entre as atividades simpática e respiratória) foi também avaliada antes (Basal) e em 30 e 60 minutos após ligadura da DAE ou em grupos Sham.

3.4. ANÁLISE DE DADOS

A coleta dos parâmetros de PP, FC, ANF e ANSt foi feita por meio do software Spike2. Para a análise da ANF e ANSt, os sinais foram previamente retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms).

3.4.1. Análise da frequência de ANF

A frequência de despolarização da ANF foi determinada pelo intervalo de tempo entre dois disparos consecutivos do nervo frênico (considerando o ponto inicial de cada disparo) e expressa em Hertz (Hz). Uma média da ANF (μV) era obtida a partir de um trecho de um minuto do registro (Figura 4) antes e em tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) pré-fixados após a ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” no grupo Sham. Isso indicava o padrão de frequência respiratória ao longo do tempo de execução do experimento.

3.4.2. Análise da ANSt

Os valores de atividade referentes a ruídos elétricos foram subtraídos dos sinais de ANSt antes da análise; o nível de ruídos era coletado através do registro que se realizava após cessar a perfusão do tecido. Assim como para a ANF, o comportamento da ANSt média (μV) era avaliado coletando uma média dessa atividade, a partir de um período de um minuto do registro (Figura 4), antes e em tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) pré-fixados após a ligadura da DAE ou Sham.

3.4.3. Análise das respostas quimiorreflexas

O reflexo quimiorreceptor periférico consistiu em um aumento na atividade respiratória central acompanhado de bradicardia, aumento na ANSt e resposta pressora associada.

O quimiorreflexo era quantificado medindo a porcentagem de aumento na frequência respiratória central, a bradicardia máxima (bpm), a resposta pressora máxima (mmHg) e a porcentagem de aumento na ANSt média durante um período de 5 segundos, no pico da resposta simpática quimiorreflexa, comparado a um período controle equivalente.

3.4.4. Análise das respostas barorreflexas

A ativação com fenilefrina resultou em um aumento da PP, produzindo simpato-inibição e bradicardia reflexas.

O ganho barorreflexo (não cardíaco) simpático era quantificado usando a razão da porcentagem de inibição da atividade simpática e a mudança de pressão ($\% \text{simpato-inibição} / \Delta \text{PP}$; $\% \cdot \text{mmHg}^{-1}$); a porcentagem de simpato-inibição foi obtida da razão da ANSt média durante o pico do aumento de pressão e a atividade média de um prévio período de tempo equivalente. O ganho barorreflexo bradicárdico foi quantificado como $\Delta \text{FC} / \Delta \text{PP}$ ($\text{bpm} \cdot \text{mmHg}^{-1}$).

3.4.5. Análise do acoplamento entre as atividades simpática e respiratória

A modulação da atividade respiratória-simpática foi avaliada no tempo controle (basal) e 30 e 60 minutos após ligadura da DAE ou “ligadura fictícia” no grupo Sham.

Considerando que os registros da ANF e ANSt eram feitos simultaneamente, a ANSt integrada era dividida em quatro fases, de acordo com o intervalo de tempo entre dois disparos do nervo frênico (considerando o ponto inicial de cada disparo): expiração final (Ef), inspiração (I), pós-inspiração (PI) e expiração média (Em) (Zoccal, *et al.*, 2008) (Figura 4). Uma média da ANSt média (μV) em cada uma dessas fases era obtida a partir de um trecho de um minuto do registro antes e nos tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) após a ligadura da DAE ou Sham.

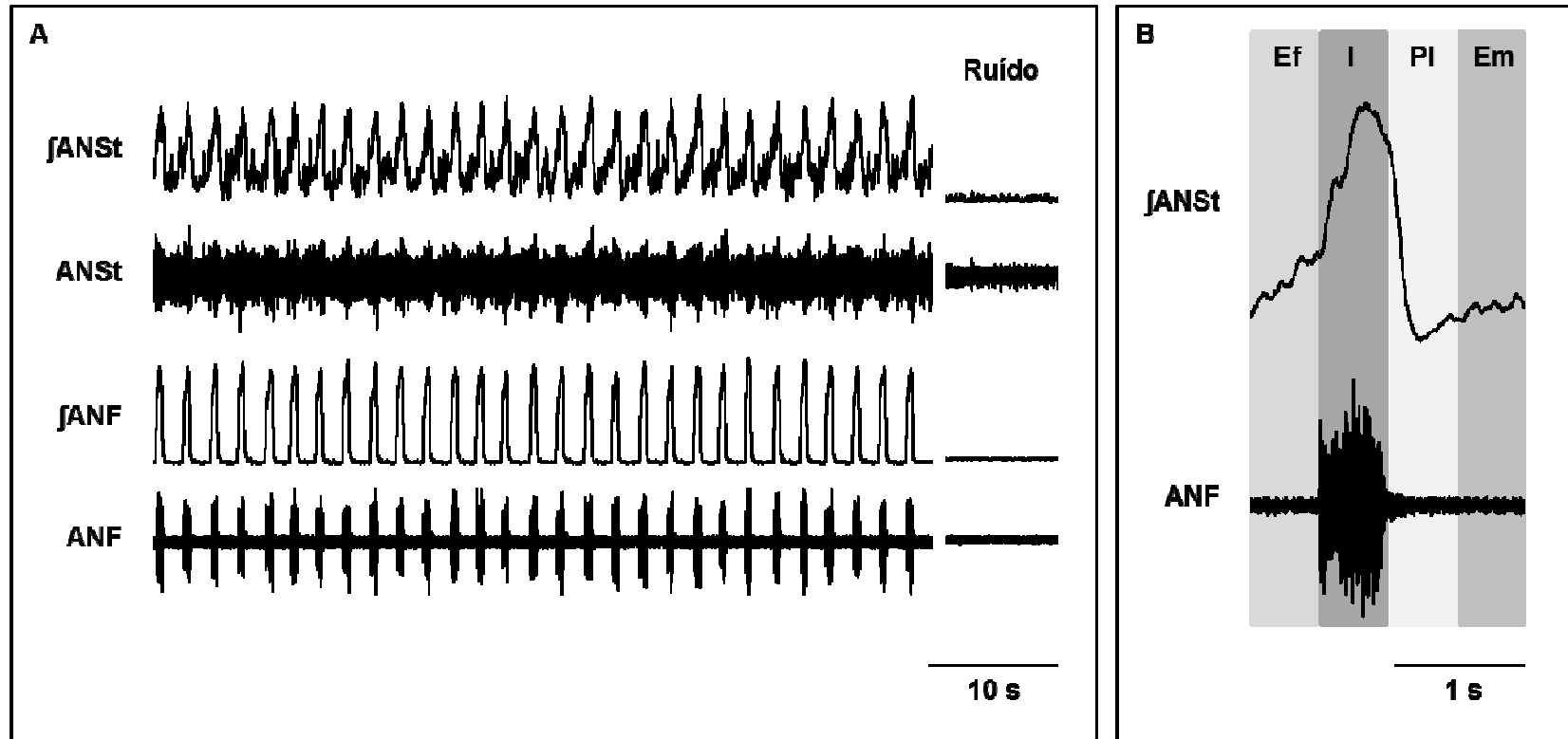


Figura 4. (A) Traçados representativos de uma preparação *in vitro* representativa, mostrando as atividades originais e integradas (J) do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt) durante um período de um minuto de registro; à direita, o registro do ruído elétrico correspondente a cada nervo, coletado ao final de cada experimento. (B) Registro obtido da média da ANSt em cada uma dessas fases relacionadas ao nervo frênico (Ef – expiração final, I – inspiração, PI – pós-inspiração e Em – expiração média) a partir de um trecho de um minuto do registro (painel A).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*, além de teste *t* de *Student* ou teste *t* para amostras em em par. O nível de significância foi considerado para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ÁREA DE RISCO, MUDANÇAS ELETROCARDIOGRÁFICAS E HEMODINÂMICAS APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA *IN VITRO*

A ligadura da DAE induziu mudanças transientes no ECG (Figura 5A e 5B) em muitas preparações (13 de 21 animais), consistentes com IM. Dentre esses 13 animais, 11 exibiram arritmias ventriculares pós-ligadura, enquanto 2 apresentaram bloqueio atrioventricular. Esses distúrbios duraram, em média, $34,0 \pm 4,6$ minutos.

A área miocárdica de risco foi em média $36,3 \pm 1,1$ % do ventrículo esquerdo nos animais com ligadura da DAE (n = 21, Figura 6A).

A ligadura da DAE produziu alterações de desempenho mecânico do ventrículo esquerdo, observando-se um aumento na PDFVE e diminuição na $dP/dt+$ já no primeiro minuto após a ligadura (** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$; respectivamente, n = 7; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (veja Figura 6B e Tabela 1). Essas alterações tenderam a se acentuar com o passar do tempo.

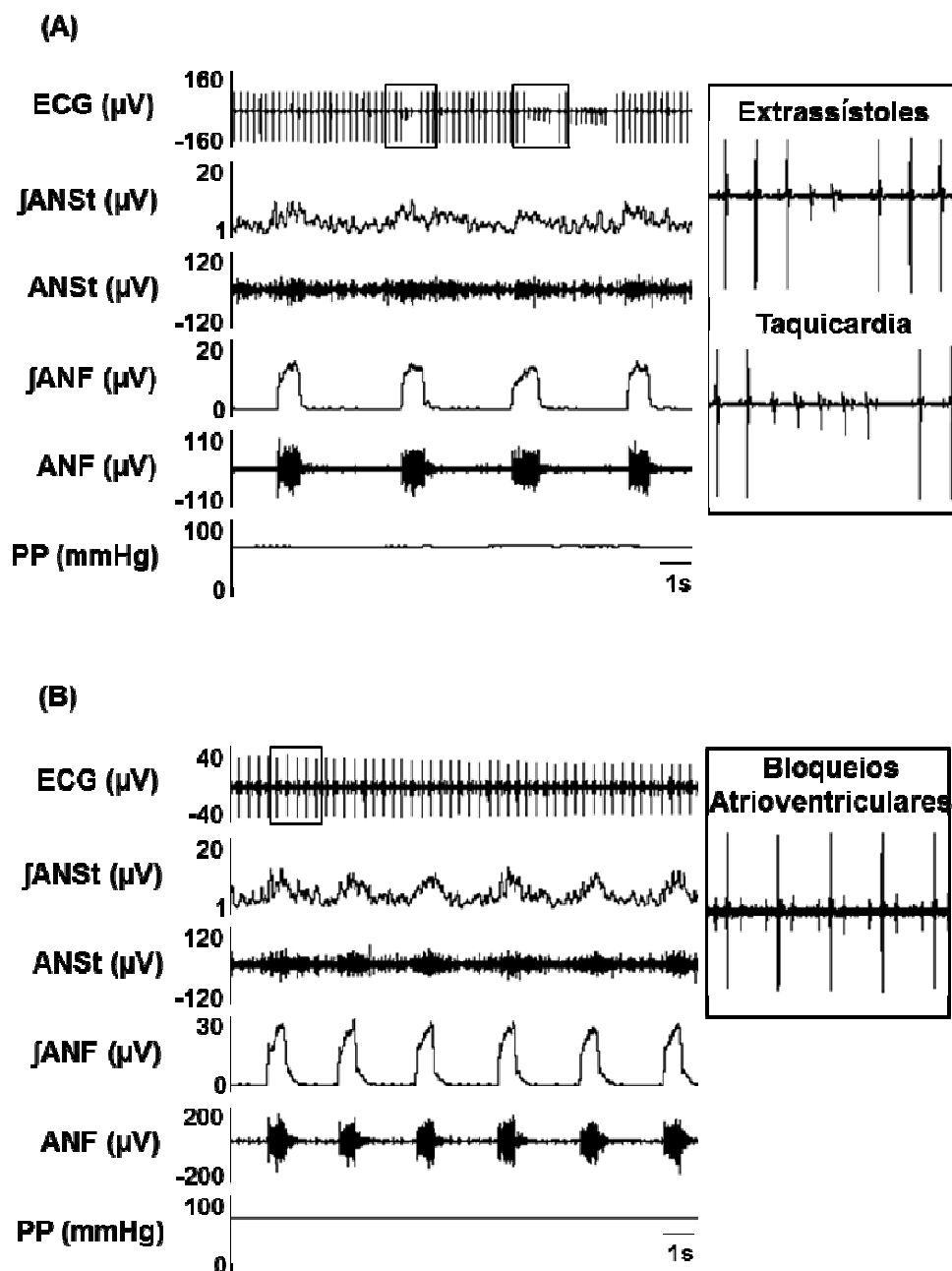


Figura 5. Registros representativos de dois ratos mostrando mudanças transitientes no eletrocardiograma (ECG) após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE): (A) Extrassístoles e taquicardia ventricular ocorreram pós-ligadura em alguns animais; (B) Bloqueio atrioventricular iniciando logo após ligadura da DAE. Essas mudanças no ECG duraram $34,0 \pm 4,6$ minutos. $\int\text{ANSt}$ e ANSt – atividade integrada e original do nervo simpático torácico, respectivamente; $\int\text{ANF}$ e ANF – atividade integrada e original do nervo frênico, respectivamente; PP – pressão de perfusão.

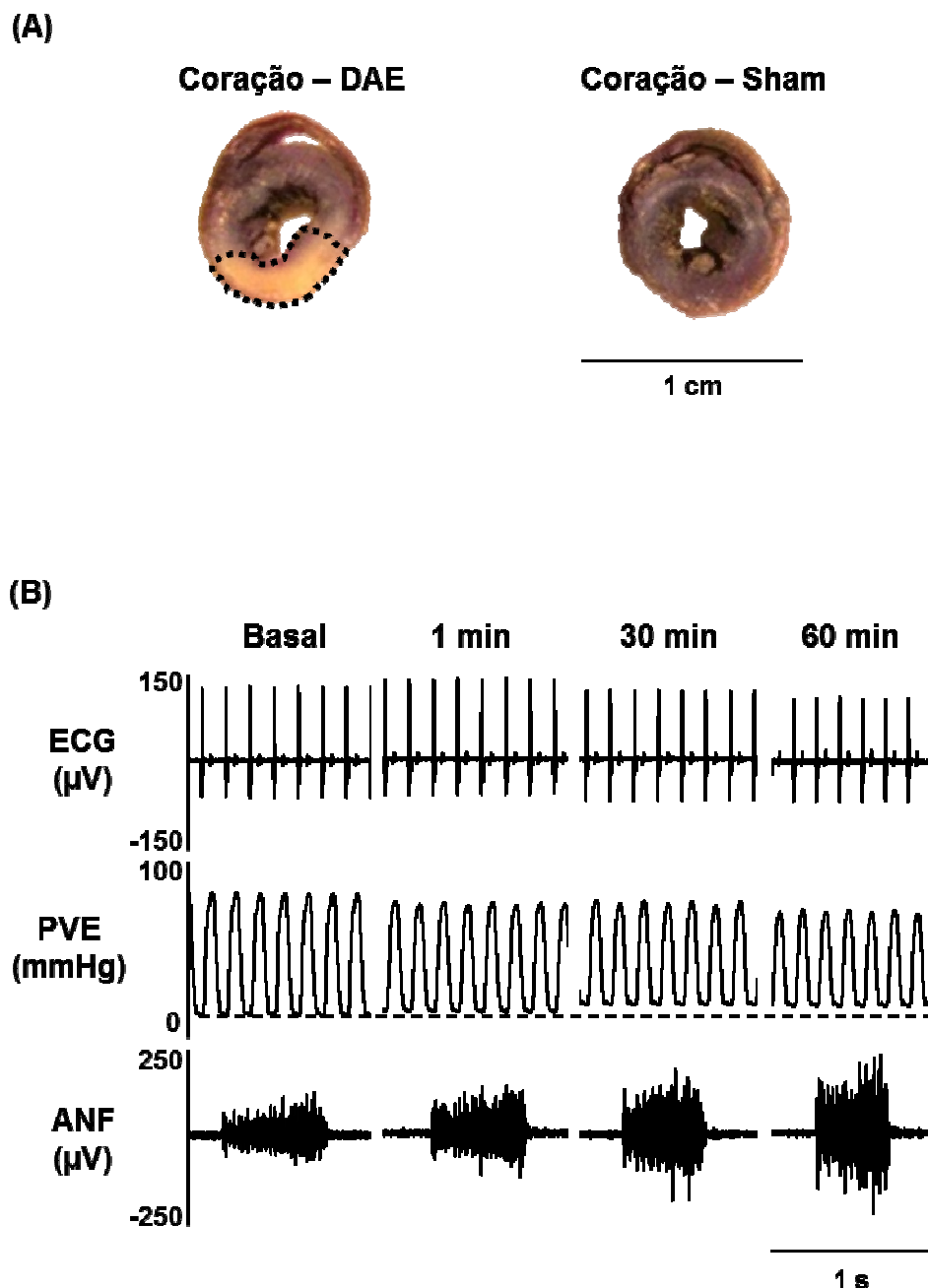


Figura 6. (A) Fotografia típica mostrando secções transversais medianas de corações marcados com o corante azul de Evans. O corte transversal do coração com ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (à esquerda) apresentava uma área marcada em azul (parte viável) versus uma área miocárdica de risco que não absorveu o corante (área pálida, delineada em preto), correspondendo à área em risco. Em contraste, o coração Sham estava completamente marcado com o corante azul de Evans. (B) Registro mostrando a pressão ventricular esquerda (PVE) antes (Basal) e 1, 30 e 60 minutos após ligadura da DAE. ECG – eletrocardiograma; ANF – atividade do nervo frênico.

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos antes (Basal) e minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda *in vitro* (n = 7).

| | Basal | 1 min | 30 min | 60 min |
|--|--------------|---------------|---------------|---------------|
| PSVE (mmHg) | 71,1 ± 5,9 | 70,6 ± 3,4 | 69,0 ± 3,5 | 66,9 ± 3,7 |
| PDFVE (mmHg) | 7,5 ± 1,4 | 13,2 ± 2,0 ** | 14,7 ± 2,6 ** | 14,9 ± 2,4 ** |
| dP/dT+ VE (mmHg.s⁻¹) | 1794 ± 173 | 1559 ± 107 * | 1530 ± 111 * | 1460 ± 107 ** |
| dP/dT- VE (mmHg.s⁻¹) | -1462 ± 187 | -1275 ± 133 | -1298 ± 141 | -1254 ± 140 |

* P<0,05 e ** P<0,01 comparado ao Basal. PSVE – pressão sistólica do ventrículo esquerdo; PDFVE – pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; dP/dT do ventrículo esquerdo – valor máximo e mínimo da taxa de variação de pressão no tempo.

4.2. PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS E ANSt

Aos 30 minutos após ligadura da DAE, a ANSt média estava elevada ($45,4 \pm 6,7 \%$), alcançando valores ainda mais altos em 60 minutos ($117,2 \pm 17,5 \%$, $P < 0,01$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) quando comparado aos valores pré-ligadura. A FC aumentou à partir de 45 minutos pós-ligadura quando comparado aos valores pré-ligadura ($2,8 \pm 0,7 \%$ em 45 minutos e $3,3 \pm 0,7 \%$ em 60 minutos, $P < 0,01$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) [Figuras 7(Ai) e 7(Aiii); $n = 21$, $P < 0,01$]. Nos animais Sham, essas alterações não foram observadas [Figuras 8(Ai) e 8(Aiii); $n = 19$, $P > 0,05$].

Nenhuma mudança na PP foi encontrada ao longo dos 60 minutos de registro após ligadura da DAE ou em ratos Sham [Figuras 7(Aii) e 8(Aii)]. A frequência de ANF aumentou em ambos os grupos, DAE e Sham, em um nível similar [Figuras 7(Aiv) e 8(Aiv), $P < 0,01$].

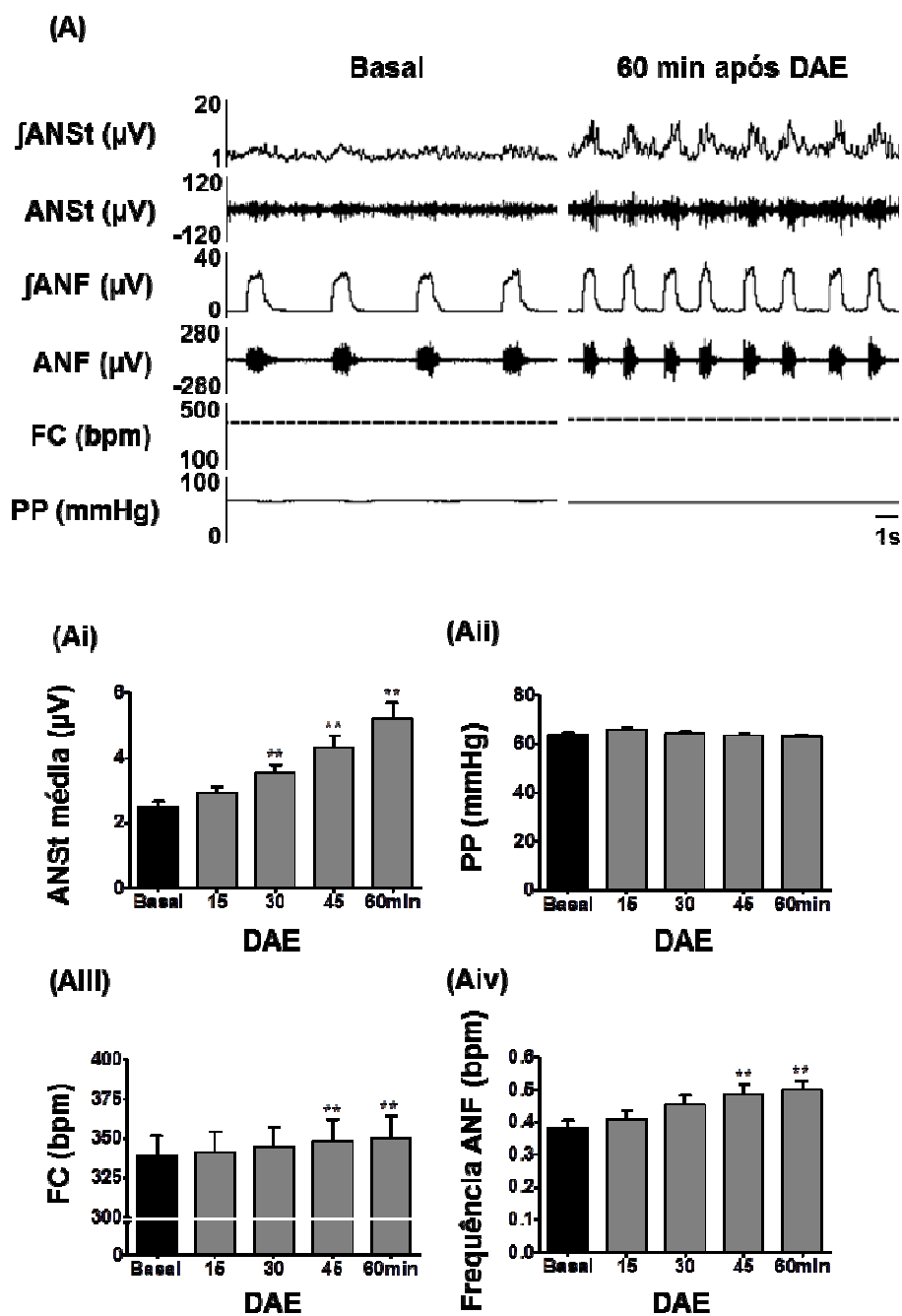


Figura 7. (A) Traçado típico da atividade integrada (\int) e original do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt), frequência cardíaca (FC) e pressão de perfusão (PP) antes (Basal) e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE). Médias da ANSt média, PP, FC e frequência de ANF antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da DAE (Ai, Aii, Aiii e Aiv, respectivamente, $n = 21$). ** $P < 0,01$ comparado ao Basal.

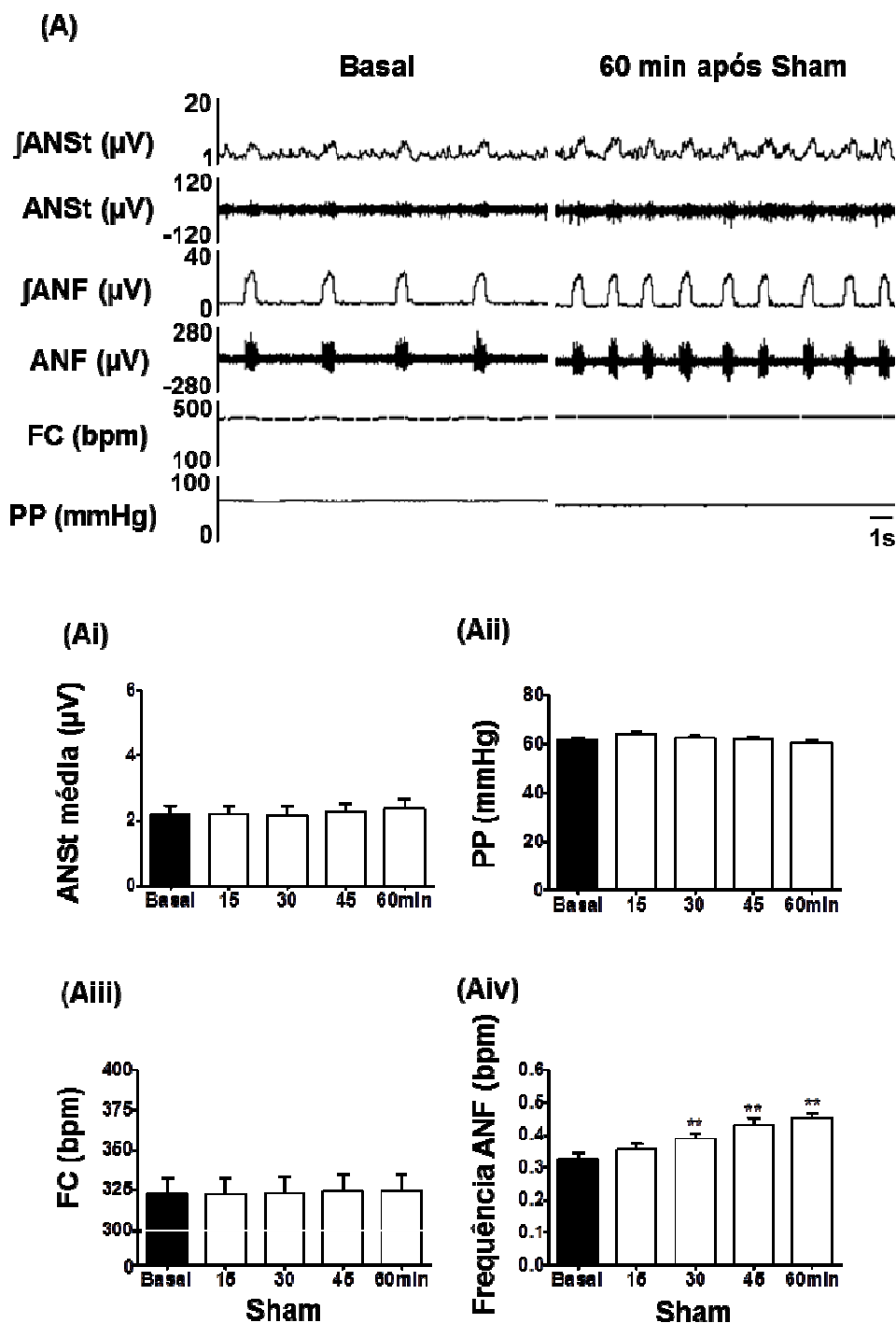


Figura 8. (A) Registro típico da atividade integrada (*j*) e original do nervo frênico (ANF) e do nervo simpático torácico (ANSt), frequência cardíaca (FC) e pressão de perfusão (PP) antes (Basal) e 60 minutos após “ligadura fictícia” nos animais do grupo Sham. Médias da ANSt média, PP, FC e frequência de ANF antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após Sham (Ai, Aii, Aiii e Aiv, respectivamente, $n = 21$). ** $P < 0,01$ comparado ao Basal.

4.3. REFLEXO QUIMIORRECEPTOR PERIFÉRICO

O componente simpato-excitatório da resposta à ativação quimiorreceptora periférica estava exarcebado 60 minutos após ligadura da DAE para todas as doses de NaCN testadas (0,03 % – 25, 50 e 75 μ L: 49,7; 45,3 and 26,8 % de aumento, respectivamente, quando comparado às mesmas doses no grupo Sham) (Figura 9A e 9B; n = 7 cada grupo, $P < 0,01$; teste *t* de *Student* não pareado). Embora tenha sido observado aumento na resposta simpática, não houve mudanças nas respostas quimiorreflexas de frequência respiratória, PP e FC (Figura 9C, 9D e 9E) entre os dois grupos para as diferentes doses testadas.

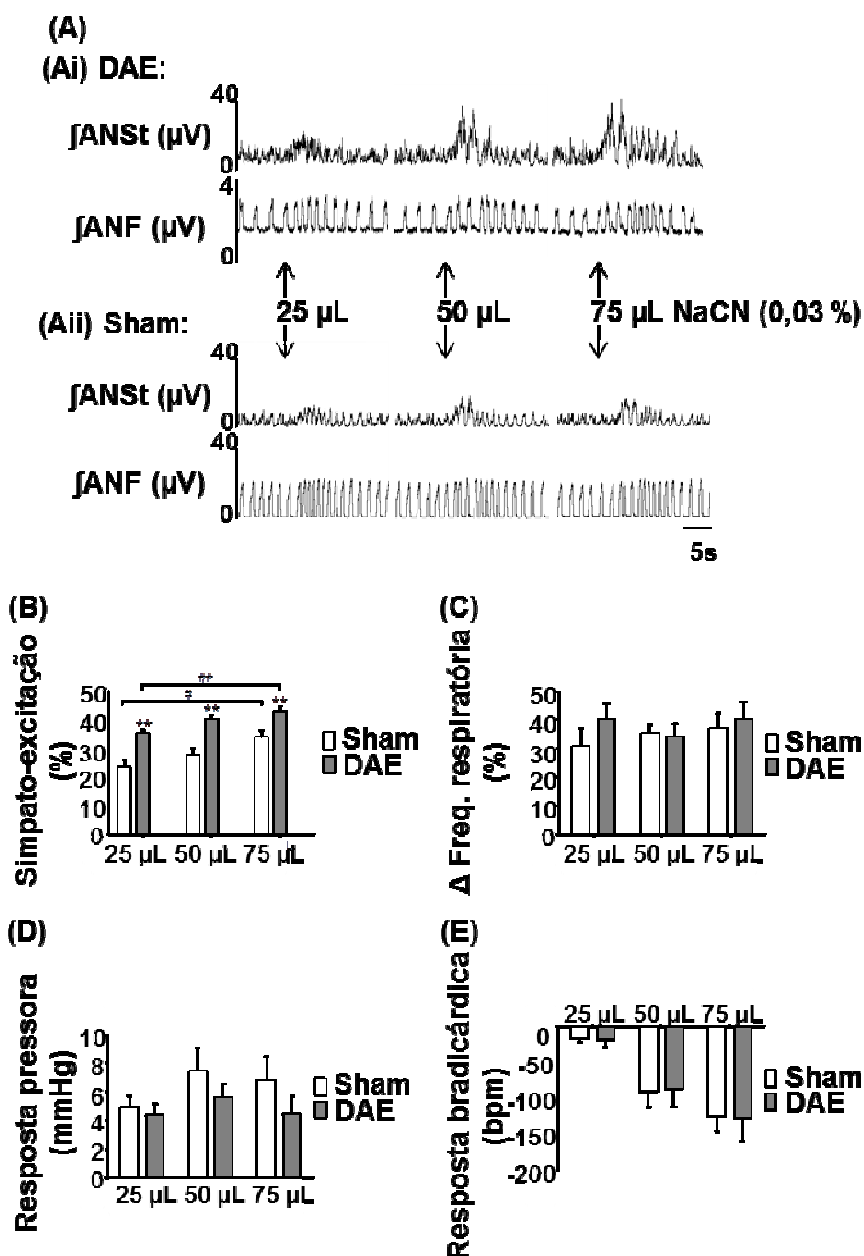


Figura 9. Respostas quimiorreflexas periféricas a doses de NaCN (0,03 % – 25, 50 and 75 μ L, i.a.) 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” no grupo Sham (n = 7 cada grupo). (A) Registros de um rato com ligadura da DAE (Ai) e um rato Sham (Aii), mostrando simpato-excitação para todas as doses testadas. (B) Mudança na resposta simpato-excitatória (** P<0,01 comparado ao Sham). Diferença na magnitude da simpato-excitação entre as doses usadas (# P<0,05 e ## P<0,01). Respostas quimiorreflexas de frequência respiratória (C), pressora (D) e bradicárdica (E) entre os dois grupos. \int ANSt – atividade integrada do nervo simpático torácico; \int ANF – atividade integrada do nervo frênico.

4.4. REFLEXO BARORRECEPTOR

O efeito pressor e o ganho barorreflexo (não cardíaco) simpático (%simpato-inibição/ Δ PP) gerados pela fenilefrina foram significativamente diferentes 60 minutos após ligadura da DAE em comparação aos valores no grupo Sham (Figuras 10A e 10B; n = 6 cada grupo, $P < 0,01$; teste *t* de *Student* não pareado). A resposta pressora à fenilefrina estava aumentada (DAE $31,5 \pm 1,3$ versus Sham $23,1 \pm 1,2$ mmHg, $P < 0,01$) e o ganho deprimido (DAE $1,3 \pm 0,1$ versus Sham $2,0 \pm 0,1$ %. mmHg^{-1} ; n = 6 cada grupo, $P < 0,01$). A bradicardia barorreflexa não foi afetada pela ligadura da DAE (Figura 10C).

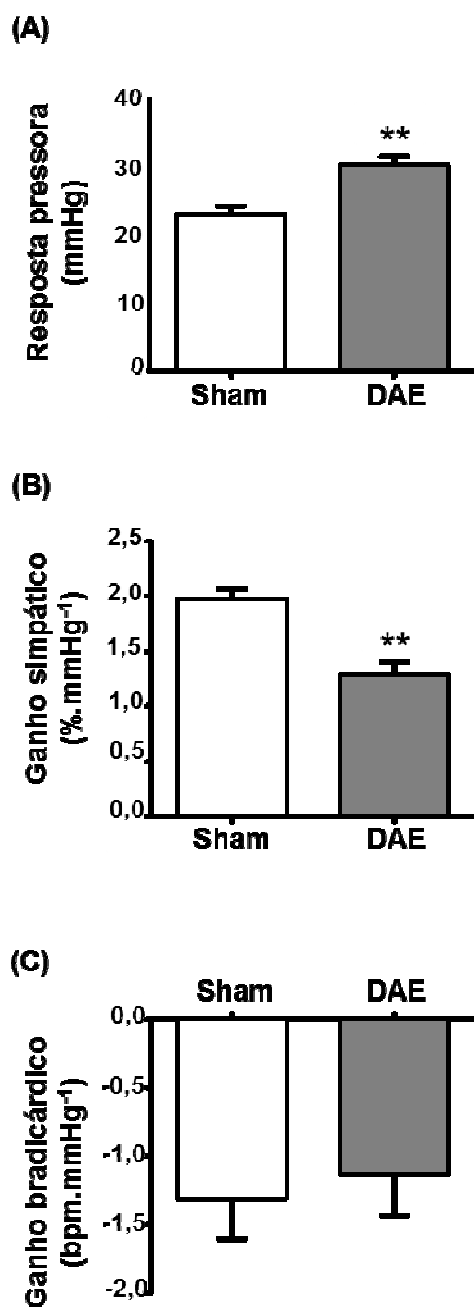


Figura 10. Respostas reflexas barorreceptoras induzidas pela fenilefrina (30 μg , i.a.) 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (n = 6 cada grupo). (A) e (B) Mudanças na resposta pressora gerada pela fenilefrina e no ganho simpático (** $P < 0,01$ comparado ao Sham). (C) Ganho bradicárdico entre os grupos DAE e Sham.

4.5. TONOS SIMPÁTICO E VAGAL CARDÍACOS

O tono simpático cardíaco estava elevado após ligadura da DAE. Houve uma maior queda na FC, após o bloqueio com atenolol, no grupo DAE quando comparado ao Sham (n = 5, $P < 0,05$; teste *t* de *Student* não pareado). O tono vagal cardíaco, avaliado por meio da vagotomia bilateral, não foi afetado pela ligadura da DAE, uma vez que a bradicardia gerada pela secção dos nervos vagos em ambos os grupos, DAE e Sham, foram similares (n = 5; $P > 0,05$, teste *t* de *Student* não pareado).

O nível da ANSt média também não foi atenuado pela vagotomia bilateral (Antes da ligadura da DAE: $2,9 \pm 0,2$; 60 minutos após ligadura da DAE/antes da vagotomia: $4,3 \pm 0,3$; e 15 minutos após vagotomia: $7,2 \pm 0,6 \mu V$), excluindo a possibilidade de um mecanismo vagal estar mediando hiperatividade simpática após ligadura da DAE.

Tabela 2. Mudanças na frequência cardíaca (FC) geradas pelo atenolol e vagotomia bilateral 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) ou “ligadura fictícia” (grupo Sham) *in vitro*.

| | Atenolol (20 µg/mL): ΔFC (bpm) | Vagotomia bilateral: ΔFC (bpm) |
|---------------------------|---|---|
| Grupo Sham (n = 5) | -81,6 ± 7,4 | 13,9 ± 2,4 |
| Grupo DAE (n = 7) | -107,8 ± 8,0 * | 11,6 ± 1,8 |

* P<0,05 comparado ao grupo Sham.

4.6. MECANISMOS MEDIANDO SIMPATO-EXCITAÇÃO APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA

4.6.1. Angiotensina II

Os resultados obtidos até aqui mostravam ocorrer seguramente uma simpato-excitação após a ligadura coronariana. Os protocolos subsequentes visaram tentar esclarecer a origem dessa resposta. Em primeiro lugar, foi avaliado o envolvimento de receptores AT1 na mediação da simpato-excitação. O bloqueio com losartan foi realizado a partir de 1 hora após ligadura da DAE e seus efeitos sobre a atividade simpática foram avaliados até 3 horas após a ligadura. A ANSt média foi significativamente atenuada em presença de losartan apenas na avaliação feita 3 horas após ligadura da DAE (ou seja, 2 horas após bloqueio com losartan), constatando-se redução na ANSt média de 33,8 % quando comparado ao grupo DAE que recebeu salina (grupo Losartan-DAE, n = 10 versus grupo Salina-DAE, n = 9, * $P < 0,05$; teste *t* de *Student* não pareado) (Figura 11), sugerindo que um mecanismo mediado pelo receptor AT1 estava presente a partir desse tempo.

A PP foi mantida estável para ambos os grupos, excluindo qualquer influência dos barorreceptores nas respostas observadas.

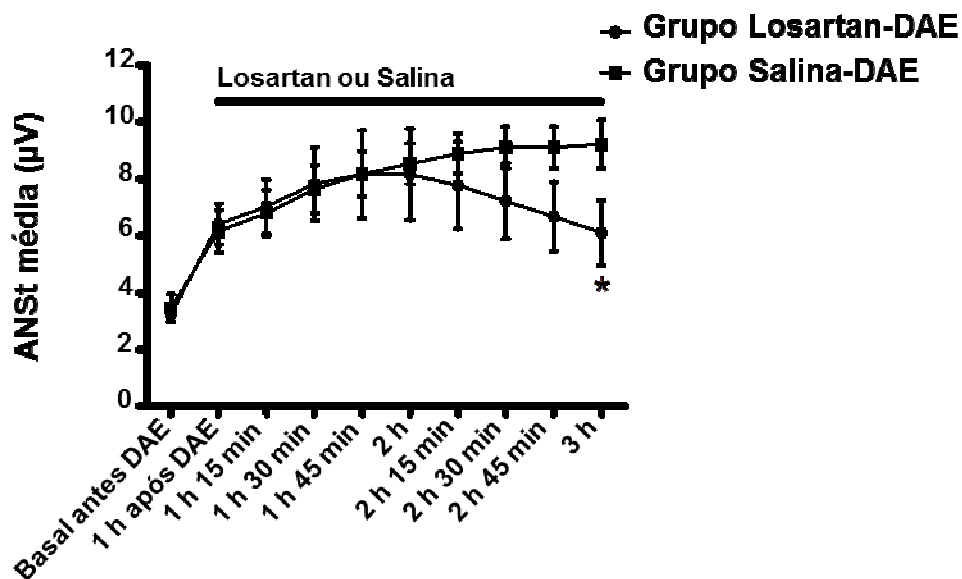


Figura 11. Efeito do losartan (40 μ M adicionado ao perfusato) sobre a atividade do nervo simpático torácico (ANSt) à partir de 1 hora até 3 horas após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (grupo Losartan-DAE: n = 10; grupo Salina-DAE: n = 9). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina-DAE.

4.6.2. Transecção da medula espinhal

Considerando que o mecanismo angiotensinérgico ocorreu em horas (aproximadamente 3 horas) após ligadura da DAE, outro possível mecanismo contribuindo para iniciação da simpato-excitação foi investigado. Sendo assim, foi realizada a avaliação de um mecanismo espinhal.

Em ratos com transecção da medula espinhal, a ANSt média estava aumentada dentro de 30 minutos após ligadura da DAE (grupo DAE – Transecção: $2,7 \pm 0,2$ versus Basal $1,6 \pm 0,2 \mu\text{V}$, $P < 0,01$, $n = 5$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 12B) comparado com o grupo Sham (grupo Sham – Transecção: $1,4 \pm 0,4$ versus Basal $1,2 \pm 0,3 \mu\text{V}$, $P > 0,05$, $n = 5$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 12A). Assim como observado nos ratos com medula espinhal intacta, a ANSt média continuou a aumentar em função do tempo após ligadura da DAE no grupo com transecção espinhal, atingindo valores mais elevados em 60 minutos ($3,9 \pm 0,5 \mu\text{V}$; $P < 0,01$).

Em relação à FC, houve uma queda significativa após a realização da transecção da medula espinhal, devido à retirada de suas vias autonômicas de controle. Embora não tenham sido observadas mudanças na FC dentro de 60 minutos após ligadura da DAE no grupo com transecção espinhal (Figura 13B), esta estava reduzida no tempo de 60 minutos no grupo Sham transecionado ($P < 0,01$, $n = 5$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 13A), sugerindo uma simpato-ativação no grupo com ligadura da DAE.

O aumento na atividade simpática gerado pela ligadura da DAE em ratos com transecção da medula espinhal (30 min: $73,7 \pm 11,7$; 45 min: $112,0 \pm 15,5$; e 60 min pós-ligadura: $147,6 \pm 23,9 \%$; $n = 5$) foi similar ao observado nos ratos com medula espinhal intacta (30 min: $45,4 \pm 6,7$; 45 min: $78,7 \pm 11,7$; e 60 min pós-ligadura: $117,3 \pm 17,5 \%$; $n = 21$, $P > 0,05$, teste *t* de Student não pareado) (Figura 12C).

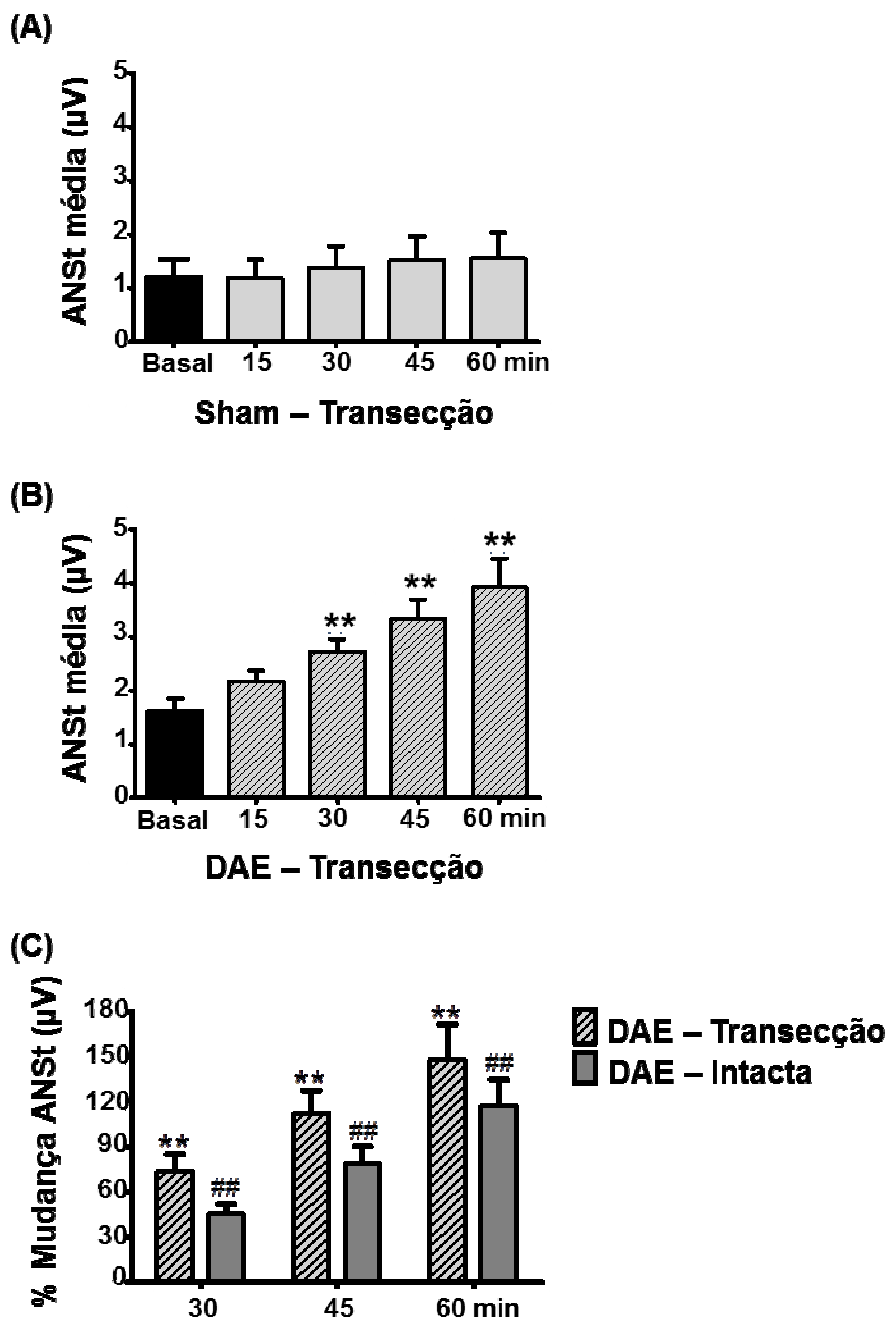


Figura 12. Atividade do nervo simpático torácico (ANSt) nas preparações submetidas a transecção da medula espinal: ANSt média antes (Basal) e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (B; n = 5) ou “ligadura fictícia” em ratos Sham (A; n = 5). (C) Porcentagem de mudança na ANSt média nos tempos de 30, 45 e 60 minutos após ligadura da DAE em ratos com transecção espinal (grupo DAE – Transecção; n = 5, ** P<0,01 comparado ao valor basal do respectivo grupo) e em ratos com medula espinal intacta (grupo DAE – Intacta; n = 21, ### P<0,01 comparado ao respectivo basal).

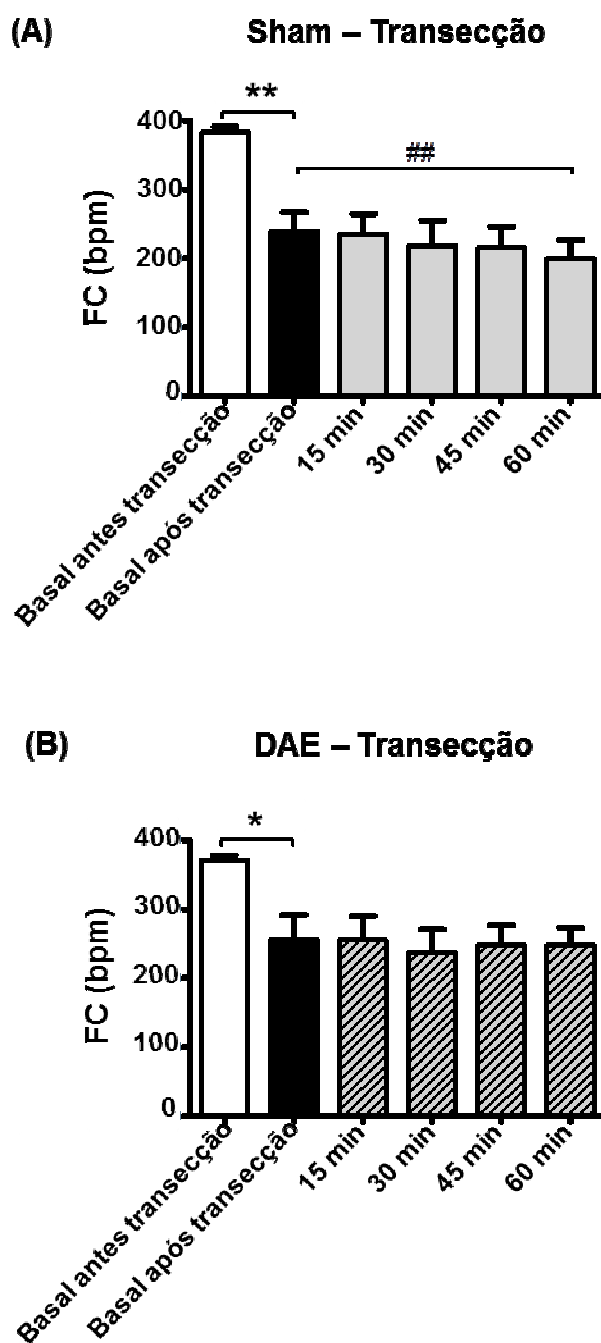


Figura 13. Frequência cardíaca (FC) média antes (Basal antes da transecção) e após (Basal após transecção) transecção da medula espinhal e 15, 30, 45 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (B; grupo DAE – Transecção, n = 5) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (A; grupo Sham – Transecção, n = 5). ** $P < 0,01$ indica diferença entre FC basal antes e após transecção no grupo Sham; * $P < 0,05$ indica diferença entre FC basal antes e após transecção no grupo DAE; e ## $P < 0,01$ indica diferença entre FC basal após transecção e 60 minutos após “ligadura fictícia” no grupo Sham.

4.7. ACOPLAMENTO ENTRE AS ATIVIDADES SIMPÁTICA E RESPIRATÓRIA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA

A ANSt média foi medida em quatro fases do ciclo respiratório – expiração final (Ef), inspiração (I), pós-inspiração (PI) e expiração média (Em), como descrito no item 3.4.5. Essa medida foi realizada nos tempos de 30 e 60 minutos após ligadura da DAE (n = 21) e em ratos Sham (n = 19) e foi observada que a ANSt média estava elevada em todas as fases inspiratória (I) e expiratórias (Ef, PI e Em) analisadas no grupo DAE ($P < 0,01$ comparado ao basal; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 14A), sem mudanças no grupo Sham $P > 0,05$ comparado ao basal; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 14B). A magnitude desses aumentos foi similar entre as fases no grupo DAE ($P > 0,05$; ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida por teste *Post Hoc* de *Tukey*) (Figura 14A). Esses dados indicam que o aumento da força do acoplamento simpático-respiratório após ligadura da DAE não é seletivo para uma fase específica do ciclo respiratório.

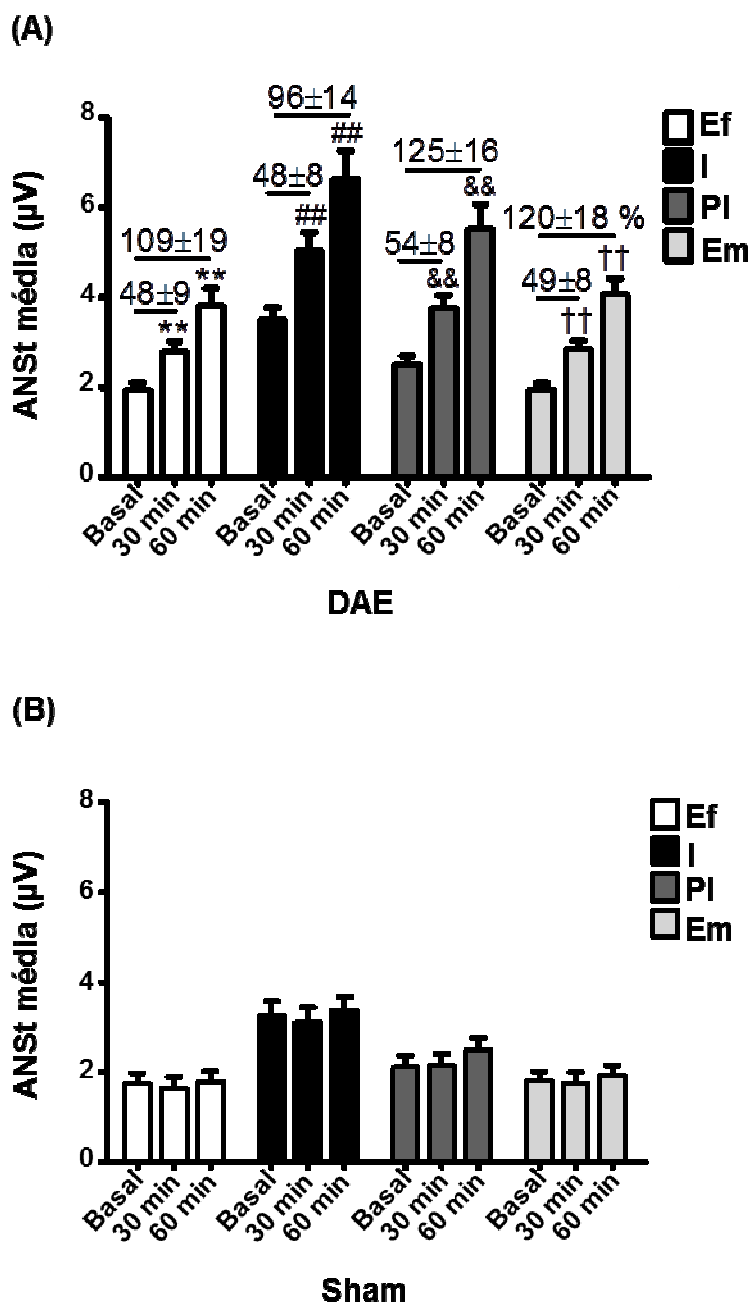


Figura 14. Acoplamento entre as atividades simpática e respiratória: Atividade integrada média do nervo simpático torácico (ANSt) em quatro fases do ciclo respiratório (calculada de acordo com o intervalo de tempo entre dois disparos do nervo frênico) – expiração final (Ef), inspiração (I), pós-inspiração (PI) e expiração média (Em) – antes (Basal) e 30 e 60 minutos após ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda (DAE) (A; n = 21) ou “ligadura fictícia” em animais Sham (B; n = 19). **, ##, &&, †† P<0,01 comparado ao basal do respectivo grupo; a magnitude de aumento nos tempos de 30 e 60 minutos em relação à linha basal está expressa em porcentagem.

5. DISCUSSÃO

A hiperatividade crônica do sistema nervoso simpático após IM tem sido intensamente pesquisada, uma vez que a ativação simpática parece estar envolvida no aparecimento de arritmias ventriculares, o que predispõe à instabilidade hemodinâmica e morte súbita. Por outro lado, as respostas agudas do sistema nervoso autonômico após a ocorrência do IM, bem como os mecanismos envolvidos nessas respostas, ainda carecem de estudos mais detalhados.

Nas últimas décadas, estudos têm relatado respostas simpáticas aferentes e eferentes cardíacas súbitas (no primeiro minuto) à isquemia transiente promovida pela oclusão de curta duração da coronária em gatos anestesiados (Brown, 1967, Malliani, *et al.*, 1969, Brown & Malliani, 1971, Lombardi, *et al.*, 1984, Ninomiya, *et al.*, 1986) e cães (Felder & Thames, 1981). Entretanto, esses estudos falharam em mostrar ativação sustentada da descarga aferente, bem como múltiplas respostas reflexas tempo-dependentes e mecanismos mediando essas respostas nos minutos que seguem à oclusão. Assim, o presente estudo procurou preencher essa lacuna do conhecimento, fornecendo informações precisas sobre o curso temporal da ativação simpática eferente após a ligadura coronariana. Em nosso trabalho evidenciamos, pela primeira vez, na preparação tronco cerebral-coração em rato, que há uma ativação precoce e sustentada de fibras eferentes simpáticas após ligadura permanente da DAE. Essa afirmação decorre do fato de que efetuamos a medida direta da ANSt numa preparação isenta do efeito confundidor dos anestésicos gerais. A atividade simpática torácica estava significativamente aumentada 30 minutos, e continuou aumentando ao longo dos 60 minutos de registro, após ligadura da DAE na presente preparação. Embora não tenha sido mensurado diretamente o fluxo simpático cardíaco, o aumento na FC basal e na resposta bradicárdica gerada pelo atenolol após ligadura corroboram uma elevada descarga simpática cardíaca.

5.1. CURSO TEMPORAL DO DESBALANÇO AUTONÔMICO APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA

A maioria dos estudos em humanos têm utilizado métodos indiretos para obter informação sobre eventuais mudanças na atividade simpática após IM. Estudos recentes vêm avaliando a concentração de catecolaminas no sangue de pacientes com IM (Karlsberg, *et al.*, 1981, McAlpine, *et al.*, 1988, Sigurdsson, *et al.*, 1993, Foy, *et al.*, 1995). Esses estudos mostraram ligeiro aumento das catecolaminas no sangue venoso imediatamente após IM, tendo seus níveis normalizados dentro de 12 horas; a menos que insuficiência cardíaca se desenvolva. Um fator limitador do uso dessa medida na extrapolação da atividade simpática dirigida para o coração é que a contribuição deste órgão é pequena em relação aos demais órgãos do corpo. Portanto, apenas com base na dosagem sanguínea é incerto se há efetivamente aumento da atividade simpática dirigida especificamente para o coração. Além disso, os níveis plasmáticos podem ser afetados por variações regionais da liberação de catecolaminas e por mudanças na taxa de *clearance* (Esler, *et al.*, 1990). Sendo assim, a avaliação dos níveis plasmáticos de catecolaminas não constitui boa estimativa do fluxo simpático cardíaco (Esler, *et al.*, 1990). O *spillover* de catecolaminas cardíacas é um indicador mais fidedigno de atividade nervosa simpática cardíaca, entretanto sua utilização em pacientes no pós-infarto é dificultada por ser método invasivo (Esler, *et al.*, 1988).

A variabilidade da frequência cardíaca também vem sendo investigada em pacientes após IM (Lombardi, *et al.*, 1987, Bigger, *et al.*, 1991, Lombardi, *et al.*, 1996). A análise da variabilidade da frequência cardíaca permite investigar flutuações do balanço autonômico que ocorrem durante períodos de tempo curtos, com registros do ECG por 5 a 10 minutos, ou prolongados, com registros de 24h (Task Force, 1996). Para essa avaliação, dois métodos são normalmente utilizados: um inclui medidas no domínio de tempo, usando índices estatísticos extraídos de variações temporais de intervalos do pulso (ms) ou de percentuais de flutuação observados em ciclos adjacentes (%); e o outro, medidas no domínio da frequência, a qual define e separa, por meio de análise espectral, as diversas respostas de frequência (Hz) observadas nas variações das séries temporais de intervalos R-R (Task Force, 1996). Apesar de esta metodologia possibilitar uma avaliação não invasiva e seletiva da função autonômica, as interpretações dos índices obtidos são

muito complexas, podendo gerar conclusões incorretas ou extrapolações precipitadas (Task Force, 1996). Incoerências têm sido descritas na literatura, tal como: parâmetros do domínio de tempo parecem diminuir no pós-IM, consistentes com retirada vagal, entretanto, o índice espectral de variabilidade da frequência cardíaca de baixa frequência (indicador de atividade simpática cardíaca) está também reduzido (Casolo, *et al.*, 1992, Singh, *et al.*, 1996). A sensibilidade barorreflexa é outra medida indireta que vem sendo usada em pacientes com IM (La Rovere, *et al.*, 1998). A redução da sensibilidade baroreflexa, assim como a diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (Kleiger, *et al.*, 1987, Farrell, *et al.*, 1991), constituem um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos arrítmicos e mortalidade no pós-infarto.

Todas essas metodologias indiretas que vêm sendo realizadas em humanos são muito importantes para analisar possíveis alterações da atividade autonômica cardíaca após IM, mas falham em fornecer informação sobre o curso temporal e grau de ativação simpática. Considerando que os infartos são imprevisíveis, impossibilitando obtenção de medidas basais (pré-infarto) e que é inviável monitorar a atividade de nervo simpático cardíaco diretamente em humanos sem o uso de métodos invasivos, a realização de medidas diretas da atividade nervosa simpática em modelos animais torna-se crucial para esclarecer essas questões. Conhecendo-se o perfil temporal e o grau de ativação, bem como os mecanismos envolvidos na simpato-excitação pós-infarto, futuras intervenções terapêuticas poderiam ser propostas e testadas.

Graham e colaboradores (2002) avaliaram diretamente a atividade do nervo simpático muscular vasoconstritor (ANSM) em um grupo de pacientes com IM e em grupos controles combinados; estes últimos compreendendo sujeitos normais, pacientes com doença da artéria coronária e pacientes hospitalizados sem IM. Até então, essa avaliação do nervo peroneal pela técnica de microneurografia (Wallin, *et al.*, 1993, Greenwood, *et al.*, 1999) não tinha sido usada sistematicamente para quantificar ANSM após IM. Medidas foram obtidas no período de 2 a 4 dias, as quais foram repetidas 3 e 6 meses em pacientes após IM agudo não complicado. A frequência média de ANSM estava aumentada 2 a 4 dias (primeiro ponto temporal de medida do estudo) após IM e essa mudança perdurou por, no mínimo, 6 meses, evidenciando uma hiperatividade simpática bastante prolongada. Entretanto, o início

exato da hiperatividade simpática não foi mostrado. De fato, há uma grande dificuldade de se obter tais dados de pacientes, demonstrando mudanças autonômicas precocemente após o evento isquêmico.

Em contraste, um estudo recente de Jardine e colaboradores (2005), no qual foram obtidas medidas sequenciais da atividade simpática antes e após (por 7 dias) IM em um modelo de ovinos não anestesiados, demonstrou hiperatividade simpática sustentada. Nesse estudo, os registros foram obtidos por meio de eletrodos colocados permanentemente nos nervos torácicos cardíacos pós-ganglionares. A atividade do nervo simpático cardíaco foi registrada e mostrou-se significativamente elevada 60 minutos após oclusão da coronária, alcançando valor de pico em 120 minutos e mantendo-se sustentada por 7 dias na maioria dos animais. Esses dados são similares ao curso temporal que observamos em nosso estudo com ligadura na preparação tronco cerebral-coração em rato. Apesar de usar diferentes abordagens experimentais, o estudo de Jardine e colaboradores (2005) e o presente estudo foram realizados em mamíferos e livres dos efeitos depressores dos anestésicos.

5.2. RESPOSTAS SIMPÁTICAS BARORREFLEXA E QUIMIORREFLEXA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA

De acordo com o aumento observado na atividade simpática basal, os componentes simpáticos dos dois maiores reflexos homeostáticos estavam também alterados quando testados 60 minutos após ligadura da DAE. Havia uma simpato-excitação quimiorreflexa exacerbada e um ganho barorreflexo (não cardíaco) simpático atenuado (ou seja, prejuízo na simpato-inibição), indicando supra-regulação de vias reflexas pró-simpáticas.

Pesquisadores vêm sugerindo que tanto reflexos barorreceptores cardíacos e arteriais simpato-inibitórios (Wang, *et al.*, 1991, Mancina, *et al.*, 1992, Mark, 1995) quanto reflexos excitatórios, incluindo o reflexo quimiorreceptor arterial (Chua, *et al.*, 1996) e um reflexo aferente simpático cardíaco (Wang, *et al.*, 1999), podem estar envolvidos na mediação do aumento da função nervosa simpática na ICC. Estudos têm mostrado que o reflexo quimiorreceptor periférico está aumentado em pacientes com insuficiência cardíaca (Chua, *et al.*, 1996, Chugh, *et al.*, 1996, Chua & Coats, 1997, Chua *et al.*, 1997). Em animais acordados com ICC induzida com marca-passo, Sun e colaboradores (1999) mediram a atividade do nervo simpático renal (ANSR) em resposta à estimulação dos quimiorreceptores periféricos por meio de condição hipóxica/isocápica. Foi encontrado que a magnitude das mudanças na ANSR apresentava-se maior (ou seja, maior simpato-excitação quimiorreflexa) nos coelhos com ICC do que no grupo controle. Nesses animais com ICC, a ANSR basal em normóxia estava aumentada e, interessantemente, essa hiperatividade simpática tônica foi reduzida ao se promover a inibição dos quimiorreceptores periféricos por meio da inalação de O₂ a 100 %; sem alterações no grupo controle. Sugeriu-se, então, que o aumento da função quimiorreflexa periférica pode contribuir para a ativação simpática tônica durante a ICC. Estudos em pacientes com ICC corroboram esses dados, indicando uma boa correlação entre sensibilidade quimiorreflexa exacerbada e desbalanço autonômico, capturados através de análises espectrais da variabilidade da frequência cardíaca (Ponikowski, *et al.*, 1997). Nessa investigação, hiperóxia transiente aumentou a variabilidade da frequência cardíaca (indicando diminuição da atividade simpática) nos pacientes com ICC.

Wang e colaboradores (2008) também relataram aumento da sensibilidade quimiorreflexa periférica em ratos com IC (6-8 semanas após IM). Nesse estudo, o quimiorreflexo foi estimulado usando doses de cianeto de potássio (KCN) e observou-se uma maior resposta de ANSR nos ratos com ICC que nos animais Sham. Adicionalmente, demonstraram que a concomitante estimulação química ou elétrica de aferentes simpáticos cardíacos (reflexo aferente simpático cardíaco) exacerbou ainda mais a resposta quimiorreflexa de ANSR gerada pelo KCN no grupo ICC, enquanto que a inibição desses aferentes com lidocaína atenuou essa resposta, demonstrando uma contribuição de aferentes simpáticos cardíacos mediando um maior aumento da função quimiorreflexa na ICC.

Adicionando informação a esses estudos anteriores realizados durante insuficiência cardíaca estabelecida, o presente trabalho mostrou que o componente simpático do quimiorreflexo periférico já se encontra exacerbado quando testado uma hora após ligadura da coronária, possivelmente contribuindo para a manutenção da elevação tônica da atividade simpática, assim como observado em condições de hipertensão (McBryde, *et al.*, 2013, Paton, *et al.*, 2013).

5.3. TONO VAGAL CARDÍACO E SUA ATIVAÇÃO REFLEXA

Em contraste à observação de simpato-ativação generalizada, o tono vagal cardíaco basal e a bradicardia reflexa gerada pelos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos não foram afetados quando testados 60 minutos após ligadura da DAE.

Informações variáveis estão disponíveis na literatura quanto ao comportamento tônico e reflexo do sistema nervoso parassimpático cardíaco após IM.

Em relação ao tono vagal, alguns estudos em humanos e gatos sugerem uma hiperatividade vagal cardíaca nos primeiros minutos/horas após IM (Adgey, *et al.*, 1968, Webb, *et al.*, 1972, Cerati & Schwartz, 1991, Rundqvist, *et al.*, 1997). Em gatos, Cerati & Schwartz (1991) obtiveram registros de fibra única de eferentes vagais cardíacos e observaram um aumento da atividade eferente durante o primeiro minuto após ligadura da artéria coronária; apesar de um leve declínio, a atividade manteve-se elevada acima dos níveis basais por, no mínimo, 1 hora após ligadura coronarina. Webb e colaboradores (1972) documentaram atividade vagal cardíaca aumentada 30 minutos após infarto em 41 de 74 pacientes. Nesse estudo, a hiperatividade vagal foi mais frequente no infarto inferior, enquanto que a hiperatividade simpática ocorreu no infarto anterior (comparável à ligadura da DAE realizada no presente estudo). Isso pode ser explicado por uma distribuição preferencial de aferentes vagais na parede ínfero-posterior do ventrículo esquerdo que poderia reflexamente mediar o aumento na atividade vagal cardíaca. Adicionalmente, estudo de Lombardi e colaboradores (1996) sugere uma excitação simpática e uma modulação vagal reduzida na variabilidade da frequência cardíaca em aproximadamente 3 horas após IM em humanos. No presente estudo não foram observadas mudanças no tono vagal quando testado 60 minutos após ligadura da DAE na preparação *in vitro* de rato. A ausência de prejuízo na atividade vagal cardíaca tônica pode ser devida ao tempo de avaliação usado ou a uma diferença de espécies.

Quanto ao controle reflexo, um marcante prejuízo da sensibilidade baroreflexa cardíaca (“marcador” de atividade vagal reflexa) tem sido bem estabelecido em pacientes com ICC (Goldstein, *et al.*, 1975, Thames, *et al.*, 1993), mas o tempo exato dessas medidas após IM não foi relatado. Em ratos, Kruger e colaboradores (1997) documentaram uma sensibilidade baroreflexa cardíaca reduzida quando

avaliada com nitroprussiato ou metoxamina aos 3 e 28 dias após IM, mostrando recuperação em 56 dias. Isso difere de outro estudo em ratos que, no período de 6-8 semanas após IM, ainda mostrou prejuízo na bradicardia reflexa barorreceptora gerada pela estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (Tu, *et al.*, 2010). Avaliando em horas após o evento da oclusão da coronária, o presente estudo não mostra tais alterações reflexas.

Em suma, considerando as evidências do presente estudo e aquelas relatadas em estudos prévios, parece que, imediatamente após IM, o tono vagal cardíaco e seu controle reflexo parecem estar preservados, pelo menos no que tange aos infartos produzidos pela obstrução da artéria descendente anterior levando à isquemia e hipóxia das paredes anterior e lateral do ventrículo esquerdo. Entretanto, um aumento do tono vagal cardíaco pode ser observado dependendo do local em que o infarto ocorreu (Meller & Gebhart, 1992). A preservação da atividade vagal pode ser importante para moderar quaisquer efeitos adversos gerados pela excessiva atividade simpática cardíaca.

5.4. MECANISMOS INICIANDO A ATIVAÇÃO SIMPÁTICA APÓS LIGADURA DA CORONÁRIA

O papel do SRA cerebral na modulação do fluxo simpático e da sensibilidade barorreflexa (Reid, 1992) na doença cardíaca (DiBona, *et al.*, 1995) tem sido estabelecido. Claramente, o SRA vem sendo um alvo terapêutico importante no manejo de pacientes com ICC (The SOLVD Investigators, 1991, Dietz, *et al.*, 1993, Dickstein, 2001). A eficácia dos inibidores da enzima conversora de angiotensina e de bloqueadores dos receptores de angiotensina II é vista como multifatorial, mas muitos trabalhos recentes apontam para o envolvimento da angiotensina II modulando a função simpática no sistema nervoso central (Reid, 1992, Brooks & Osborn, 1995, Brooks, 1997).

Um grande conjunto de evidências sugere que a modulação da atividade simpática pelo SRA central na ICC é mediada por receptores AT1. Dentre elas podemos elencar:

(i) Wang & Ma (2000) têm mostrado uma concentração elevada de angiotensina II no fluido cérebro-espinhal de cães com ICC induzida com marca-passo.

(ii) A expressão de receptores AT1 está supra-regulada em núcleos relacionados com o controle autonômico cardiovascular, incluindo o NTS, o órgão subfornical e o núcleo paraventricular após ICC em ratos (Yoshimura, *et al.*, 2000), e o RVLM de coelhos após ICC induzida com marca-passo (Liu, *et al.*, 2006).

(iii) Liu e colaboradores (2006) também demonstraram que a infusão intracerebroventricular de losartan atenuou a supra-regulação dos receptores AT1 no RVLM de coelhos com ICC. Ainda nesse estudo, a infusão intracerebroventricular de angiotensina II em coelhos normais estimulou as mesmas mudanças moleculares (supra-regulação de receptores AT1 e expressão de proteínas relacionadas à essa regulação) observadas na ICC, sendo que esse efeito também foi bloqueado pelo losartan; propondo com esse estudo um mecanismo contribuinte da supra-regulação de receptores AT1 do RVLM na ICC.

(iv) O bloqueio central de receptores AT1 reduziu a atividade simpática e aumentou a sensibilidade barorreflexa em coelhos com ICC (Murakami, *et al.*, 1997, Liu & Zucker, 1999).

(v) Em ratos Wistar, a infusão intracerebroventricular e a administração sistêmica de losartan reduziu a hiperatividade simpática e a PDFVE na insuficiência cardíaca induzida por ligadura da artéria coronária (Huang, *et al.*, 2009).

Os dados do presente estudo revelaram que um mecanismo angiotensinérgico mediado via receptores AT1 sustenta a elevação na descarga simpática a partir de 3 horas após ligadura da DAE.

Evidência revela que receptores AT1 localizados nos órgãos circumventriculares (por exemplo, órgão subfornical), núcleo paraventricular hipotalâmico e núcleo supra-óptico são ativados após IM e causam simpato-excitação (Huang & Leenen, 2009). De acordo com a proposta de Huang & Leenen (2009), o aumento dos níveis circulantes de angiotensina II causam agudamente uma ativação neuronal inicial do órgão subfornical e, em seguida, ativação sustentada do núcleo paraventricular promovendo a hiperativação simpática. De fato, o SRA circulante torna-se rapidamente ativado, com os níveis plasmáticos de angiotensina II marcadamente aumentados nas primeiras horas/dias após IM. Em ratos acordados, Leenen e colaboradores (1999) avaliaram o curso temporal das mudanças na angiotensina II plasmática em 6 horas, em 1, 3 e 7 dias e em 1 e 2 meses após ligadura da artéria coronária, mostrando níveis aumentados em 6 horas e, em seguida, aumentos modestos, os quais foram significantes em 7 dias e em 1 e 2 meses. Davern & Head (2007) realizaram infusão intravenosa de angiotensina II por 3 horas e 3 e 14 dias e observaram que neurônios dos órgãos circumventriculares (órgão vascular da lâmina terminalis e órgão subfornical) foram ativados no período de 3 horas, enquanto neurônios do núcleo hipotalâmico (núcleo paraventricular e núcleo supra-óptico) foram ativados de forma sustentada por mais de 14 dias da infusão de angiotensina II em coelhos normais.

Apesar de evidência desses mecanismos recentes, a presente investigação foi realizada em uma preparação descerebrada pré-colicularmente (sem barreira hemato-encefálica funcional), desprovida das regiões hipotalâmicas, excluindo, neste caso, a mediação das vias angiotensinérgicas dessas regiões na hiperatividade simpática. Além disso, é improvável que níveis suficientes de angiotensina circulante no perfusato estejam disponíveis mediando ativação, devido ao grande volume utilizado na perfusão da preparação (o que promove diluição de

sua concentração). Sendo assim, sugere-se que regiões bulbares estejam mediando a simpato-excitação observada. Nesse sentido, sabe-se que a expressão de receptores AT1 está supra-regulada após ICC no NTS (Yoshimura, *et al.*, 2000) e no RVLM (Allen, *et al.*, 1998, Liu, *et al.*, 2006, Gao, *et al.*, 2008, Zucker, *et al.*, 2009). Tais áreas bulbares estavam preservadas e funcionais na presente preparação. A existência de angiotensina II tecidual cerebral é também demonstrada pela síntese endógena de angiotensinogênio em astrócitos do bulbo (Bunnemann, *et al.*, 1992). Desta maneira, sugere-se que a ativação angiotensinérgica de núcleos do tronco cerebral pode ser suficiente para sustentar a hiperatividade simpática 3 horas após ligadura da coronária. Certamente, esse curso de tempo seria consistente com o tempo necessário para síntese proteica (MacDougall, *et al.*, 1995), e esse parece ser o caso para expressão de receptores AT1. A exacerbação de um mecanismo angiotensinérgico no NTS poderia muito bem explicar tanto o quimiorreflexo periférico elevado quanto a resposta barorreflexa deprimida, como já evidenciado anteriormente (Kasparov & Paton, 1999, Paton & Kasparov, 1999, Polson, *et al.*, 2007), enquanto que no RVLM poderia explicar a descarga simpática aumentada.

O mecanismo inicial que promove hiperatividade simpática após isquemia cardíaca em ratos pode incluir um reflexo cárdio-cárdaco simpático espinhal. Esse reflexo foi primeiramente relatado por Malliani e colaboradores (1969) após ligadura da coronária em gatos. Brown (1967) demonstrou que fibras nervosas aferentes simpáticas são ativadas durante isquemia miocárdica. Neurônios simpáticos pré-ganglionares foram demonstrados estar excitados após IM, sendo que essa excitação manteve-se sustentada após vagotomia e transecção espinhal, provando-se assim se tratar de um reflexo espinhal (Malliani, *et al.*, 1969). A excitação das fibras aferentes simpáticas cardíacas gerou aumentos na pressão arterial (Peterson & Brown, 1971), contratilidade miocárdica (Malliani, *et al.*, 1972) e FC (Malliani, *et al.*, 1973). Nos presentes experimentos com transecção espinhal, o aumento da atividade simpática após ligadura da DAE foi também observado, assim como nos animais com medula espinhal intacta. Em relação à FC, essa foi mantida e não diminuiu como observado no respectivo grupo controle, sugerindo tônus simpático cardíaco elevado. Felder & Thames (1981) levantaram dúvidas se esse reflexo seria importante em condições fisiológicas, mostrando que o reflexo cárdio-cárdaco simpático espinhal é ativado em cães com transecção espinhal, mas não com medula

espinhal intacta durante a ligadura da coronária. Eles sugeriram que vias supra-espinhais inibem esse reflexo em cães intactos. Contudo, estudo posterior de Minisi & Thames (1991) mostrou que a produção de uma maior isquemia anterior (transmural) pode prover um estímulo mais intenso às fibras aferentes simpáticas, as quais estão localizadas principalmente nas superfícies epicárdicas (Neto, *et al.*, 1974, Staszewka-Barczak, *et al.*, 1976, Barber, *et al.*, 1984), produzindo significativa resposta simpática reflexa no cão com medula espinhal intacta. Sendo assim, considerando os presentes dados negativos obtidos com losartan em 1 hora após ligadura da DAE propõem-se um mecanismo espinhal não angiotensinérgico para a iniciação do aumento do fluxo simpático após ligadura da coronária.

Além de aferentes simpáticos cardíacos, o reflexo barorreceptor arterial também pode ser alterado simultaneamente durante isquemia miocárdica devido ao seu descarregamento, promovendo aumento reflexo na atividade do nervo simpático eferente (Felder & Thames, 1979). Entretanto, a pressão de perfusão foi mantida constante durante ligadura da DAE, excluindo o papel desses receptores na presente preparação.

5.5. RELEVÂNCIA FUNCIONAL DA ATIVAÇÃO SIMPÁTICA IMEDIATA APÓS-IM

Os presentes achados indicam supra-regulação seletiva da atividade simpática, sem mudanças no tono vagal cardíaco e sua modulação reflexa. É razoável assumir que essa modulação inicial leva a um efeito protetor do coração, suportando a função cardíaca (Floras, 2009). Apesar de ativação do sistema nervoso simpático, a longo prazo, ser prejudicial à função cardíaca na insuficiência cardíaca (Pettersson, *et al.*, 2005, Floras, 2009), nos primeiros momentos após IM a simpato-excitação compensa a disfunção da contratilidade cardíaca. Adicionalmente, o controle vagal elevado (Vanoli, *et al.*, 1991, Rosenshtraukh, *et al.*, 1994) ou preservado (como encontrado no presente estudo) na fase inicial da isquemia miocárdica aguda exerceria um efeito antiarrítmico, reduzindo a mortalidade global.

6. CONCLUSÕES

- A atividade simpática estava elevada 30 minutos após ligadura da DAE.
- A simpato-excitação quimiorreflexa, em resposta ao NaCN, estava exarcebada quando avaliada 1 hora após ligadura da DAE.
- O ganho barorreflexo (não cardíaco) simpático, em resposta à fenilefrina, estava deprimido quando avaliado 1 hora após ligadura da DAE.
- O tono simpático cardíaco estava elevado quando avaliado 1 hora após ligadura da DAE.
- O tono vagal e o controle vagal reflexo não estavam alterados quando avaliados 1 hora após ligadura da DAE.
- O bloqueio de receptores AT1 atenuou a atividade simpática 3 horas após ligadura da DAE.
- A transecção da medula espinhal ao nível C1 não evitou hiperatividade simpática após ligadura da DAE.

Em síntese, o presente trabalho mostra aumento no tono simpático basal e na simpatoexcitação quimiorreflexa, mas nenhuma mudança na regulação vagal na primeira hora após ligadura da artéria coronária. Mecanismos da medula espinhal e, posteriormente, atividade angiotensinérgica elevada contribuem para a geração da simpato-excitação, da qual parte é dirigida ao coração. O entendimento detalhado da participação de quaisquer mecanismos que são responsáveis por efeitos deletérios em uma isquemia cardíaca pode auxiliar na elaboração de futuras intervenções farmacológicas efetivas imediatamente após IM.

7. REFERÊNCIAS

(1991) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* **325**: 293-302.

(1996) Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J* **17**: 354-381.

Adgey AA, Geddes JS, Mulholland HC, Keegan DA & Pantridge JF (1968) Incidence, significance, and management of early bradyarrhythmia complicating acute myocardial infarction. *Lancet* **2**: 1097-1101.

Al-Khatib SM, Stebbins AL, Califf RM, *et al.* (2003) Sustained ventricular arrhythmias and mortality among patients with acute myocardial infarction: results from the GUSTO-III trial. *Am Heart J* **145**: 515-521.

Allen AM, Moeller I, Jenkins TA, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY & Mendelsohn FA (1998) Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res Bull* **47**: 17-28.

Barber MJ, Mueller TM, Davies BG & Zipes DP (1984) Phenol topically applied to canine left ventricular epicardium interrupts sympathetic but not vagal afferents. *Circ Res* **55**: 532-544.

Bigger JT, Jr., Fleiss JL, Rolnitzky LM, Steinman RC & Schneider WJ (1991) Time course of recovery of heart period variability after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **18**: 1643-1649.

Bishop VS & Sanderford MG (2000) Angiotensin II modulation of the arterial baroreflex: role of the area postrema. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**: 428-431.

Blair RW, Chandler MJ, Bolser DC & Foreman RD (1992) Intracardiac phenylbiguanide causes excitation of spinal neurons by activation of cardiac sympathetic afferents. *Eur J Pharmacol* **216**: 119-122.

Bolser DC, Chandler MJ, Garrison DW & Foreman RD (1989) Effects of intracardiac bradykinin and capsaicin on spinal and spinoreticular neurons. *Am J Physiol* **257**: H1543-1550.

Bristow M (2003) Antiadrenergic therapy of chronic heart failure: surprises and new opportunities. *Circulation* **107**: 1100-1102.

Brooks VL (1997) Interactions between angiotensin II and the sympathetic nervous system in the the long-term control of arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**: 83-90.

Brooks VL & Osborn JW (1995) Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial pressure: an hypothesis. *Am J Physiol* **268**: R1343-1358.

Brown AM (1967) Excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibres during myocardial ischaemia. *J Physiol* **190**: 35-53.

Brown AM & Malliani A (1971) Spinal sympathetic reflexes initiated by coronary receptors. *J Physiol* **212**: 685-705.

Brunner-La Rocca HP, Esler MD, Jennings GL & Kaye DM (2001) Effect of cardiac sympathetic nervous activity on mode of death in congestive heart failure. *Eur Heart J* **22**: 1136-1143.

Bunnemann B, Fuxe K, Metzger R, Bjelke B & Ganten D (1992) The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain. *J Chem Neuroanat* **5**: 245-262.

Casolo GC, Stroder P, Signorini C, *et al.* (1992) Heart rate variability during the acute phase of myocardial infarction. *Circulation* **85**: 2073-2079.

Cerati D & Schwartz PJ (1991) Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. *Circ Res* **69**: 1389-1401.

Chua TP, Clark AL, Amadi AA & Coats AJ (1996) Relation between chemosensitivity and the ventilatory response to exercise in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* **27**: 650-657.

Chua TP, Coats AJS (1997) The role of peripheral chemoreflex in chronic congestive heart failure. *Cong Heart Failure* **3**: 22-28.

Chua TP, Ponikowski P, Webb-Peploe K, Harrington D, Anker SD, Piepoli M & Coats AJ (1997) Clinical characteristics of chronic heart failure patients with an augmented peripheral chemoreflex. *Eur Heart J* **18**: 480-486.

Chugh SS, Chua TP & Coats AJ (1996) Peripheral chemoreflex in chronic heart failure: friend and foe. *Am Heart J* **132**: 900-904.

Ciarka A, van de Borne P & Pathak A (2008) Myocardial infarction, heart failure and sympathetic nervous system activity: new pharmacological approaches that affect neurohumoral activation. *Expert Opin Investig Drugs* **17**: 1315-1330.

Clark C, Foreman MI, Kane KA, McDonald FM & Parratt JR (1980) Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *J Pharmacol Methods* **3**: 357-368.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, *et al.* (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* **311**: 819-823.

Corr PB & Gillis RA (1975) Effect of autonomic neural influences on the cardiovascular changes induced by coronary occlusion. *Am Heart J* **89**: 767-774.

Davern PJ & Head GA (2007) Fos-related antigen immunoreactivity after acute and chronic angiotensin II-induced hypertension in the rabbit brain. *Hypertension* **49**: 1170-1177.

de Lolio CA, Lotufo PA, Lira AC, Zanetta DM & Massad E (1995) [Mortality trends due to myocardial ischemia in capital cities of the metropolitan areas of Brazil, 1979-89]. *Arq Bras Cardiol* **64**: 213-216.

Dibner-Dunlap ME, Kinugawa T & Thames MD (1993) Activation of cardiac sympathetic afferents: effects of exogenous adenosine and adenosine analogues. *Am J Physiol* **265**: H395-400.

DiBona GF, Jones SY & Brooks VL (1995) ANG II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. *Am J Physiol* **269**: R1189-1196.

Dickstein K (2001) The role of losartan in the management of patients with heart failure. *Clin Ther* **23**: 1456-1477.

Dietz R, Waas W, Susselbeck T, Willenbrock R & Osterziel KJ (1993) Improvement of cardiac function by angiotensin converting enzyme inhibition. Sites of action. *Circulation* **87**: IV108-116.

Eckberg DL, Drabinsky M & Braunwald E (1971) Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med* **285**: 877-883.

Esler M, Jennings G, Lambert G, Meredith I, Horne M & Eisenhofer G (1990) Overflow of catecholamine neurotransmitters to the circulation: source, fate, and functions. *Physiol Rev* **70**: 963-985.

Esler M, Jennings G, Korner P, *et al.* (1988) Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension* **11**: 3-20.

Farrell TG, Bashir Y, Cripps T, *et al.* (1991) Risk stratification for arrhythmic events in postinfarction patients based on heart rate variability, ambulatory electrocardiographic variables and the signal-averaged electrocardiogram. *J Am Coll Cardiol* **18**: 687-697.

Felder RB & Thames MD (1979) Interaction between cardiac receptors and sinoaortic baroreceptors in the control of efferent cardiac sympathetic nerve activity during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res* **45**: 728-736.

Felder RB & Thames MD (1981) The cardiocardiac sympathetic reflex during coronary occlusion in anesthetized dogs. *Circ Res* **48**: 685-692.

Felder RB & Thames MD (1982) Responses to activation of cardiac sympathetic afferents with epicardial bradykinin. *Am J Physiol* **242**: H148-153.

Ferguson DW, Berg WJ, Roach PJ, Oren RM & Mark AL (1992) Effects of heart failure on baroreflex control of sympathetic neural activity. *Am J Cardiol* **69**: 523-531.

Floras JS (2009) Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol* **54**: 375-385.

Foreman RD (1999) Mechanisms of cardiac pain. *Annu Rev Physiol* **61**: 143-167.

Foy SG, Crozier IG, Richards AM, Nicholls MG, Turner JG, Frampton CM & Ikram H (1995) Neurohormonal changes after acute myocardial infarction. Relationships with haemodynamic indices and effects of ACE inhibition. *Eur Heart J* **16**: 770-778.

Gao L, Wang WZ, Wang W & Zucker IH (2008) Imbalance of angiotensin type 1 receptor and angiotensin II type 2 receptor in the rostral ventrolateral medulla: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension* **52**: 708-714.

Gaudron P, Kugler I, Hu K, Bauer W, Eilles C & Ertl G (2001) Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. *J Am Coll Cardiol* **38**: 33-40.

Goldstein RE, Beiser GD, Stampfer M & Epstein SE (1975) Impairment of autonomically mediated heart rate control in patients with cardiac dysfunction. *Circ Res* **36**: 571-578.

Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF & Mary DA (2002) Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation* **106**: 793-797.

Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF & Mary DA (2004) Sympathetic neural hyperactivity and its normalization following unstable angina and acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* **106**: 605-611.

Greenwood JP, Stoker JB & Mary DA (1999) Single-unit sympathetic discharge : quantitative assessment in human hypertensive disease. *Circulation* **100**: 1305-1310.

Henkel DM, Witt BJ, Gersh BJ, Jacobsen SJ, Weston SA, Meverden RA & Roger VL (2006) Ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction: a 20-year community study. *Am Heart J* **151**: 806-812.

Herrmann JL, Abarbanell AM, Weil BR, Wang Y, Poynter JA, Manukyan MC & Meldrum DR (2010) Postinfarct intramyocardial injection of mesenchymal stem cells

pretreated with TGF- α improves acute myocardial function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299**: R371-378.

Huang BS & Leenen FH (2009) The brain renin-angiotensin-aldosterone system: a major mechanism for sympathetic hyperactivity and left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction. *Curr Heart Fail Rep* **6**: 81-88.

Huang BS, Ahmad M, Tan J & Leenen FH (2009) Chronic central versus systemic blockade of AT(1) receptors and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H968-975.

Huang CH, Wang JS, Chiang SC, Wang YY, Lai ST & Weng ZC (2004) Brief pressure overload of the left ventricle preconditions rabbit myocardium against infarction. *Ann Thorac Surg* **78**: 628-633.

Huang CH, Kim SJ, Ghaleh B, Kudej RK, Shen YT, Bishop SP & Vatner SF (1999) An adenosine agonist and preconditioning shift the distribution of myocardial blood flow in conscious pigs. *Am J Physiol* **276**: H368-375.

Hull SS, Jr., Evans AR, Vanoli E, *et al.* (1990) Heart rate variability before and after myocardial infarction in conscious dogs at high and low risk of sudden death. *J Am Coll Cardiol* **16**: 978-985.

Iwamura N & Bishop VS (1980) Afferent pathways of reflex hypotension and bradycardia during coronary occlusion. *Am J Physiol* **239**: H172-180.

Jardine DL, Charles CJ, Frampton CM & Richards AM (2007) Cardiac sympathetic nerve activity and ventricular fibrillation during acute myocardial infarction in a conscious sheep model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H433-439.

Jardine DL, Charles CJ, Ashton RK, Bennett SI, Whitehead M, Frampton CM & Nicholls MG (2005) Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *J Physiol* **565**: 325-333.

Kara T, Narkiewicz K & Somers VK (2003) Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand* **177**: 377-384.

Karlsberg RP, Cryer PE & Roberts R (1981) Serial plasma catecholamine response early in the course of clinical acute myocardial infarction: relationship to infarct extent and mortality. *Am Heart J* **102**: 24-29.

Kasparov S & Paton JF (1999) Differential effects of angiotensin II in the nucleus tractus solitarius of the rat--plausible neuronal mechanism. *J Physiol* **521 Pt 1**: 227-238.

Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A & Esler MD (1995) Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* **26**: 1257-1263.

Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, Jr. & Moss AJ (1987) Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **59**: 256-262.

Kruger C, Kalenka A, Haunstetter A, *et al.* (1997) Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. *Am J Physiol* **273**: H2240-2247.

La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A & Schwartz PJ (1998) 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* **351**: 478-484.

Leenen FH, Skarda V, Yuan B & White R (1999) Changes in cardiac ANG II postmyocardial infarction in rats: effects of nephrectomy and ACE inhibitors. *Am J Physiol* **276**: H317-325.

Liu D, Gao L, Roy SK, Cornish KG & Zucker IH (2006) Neuronal angiotensin II type 1 receptor upregulation in heart failure: activation of activator protein 1 and Jun N-terminal kinase. *Circ Res* **99**: 1004-1011.

Liu JL & Zucker IH (1999) Regulation of sympathetic nerve activity in heart failure: a role for nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* **84**: 417-423.

Lombardi F, Casalone C, Della Bella P, Malfatto G, Pagani M & Malliani A (1984) Global versus regional myocardial ischaemia: differences in cardiovascular and sympathetic responses in cats. *Cardiovasc Res* **18**: 14-23.

Lombardi F, Sandrone G, Spinnler MT, Torzillo D, Lavezzaro GC, Brusca A & Malliani A (1996) Heart rate variability in the early hours of an acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **77**: 1037-1044.

Lombardi F, Sandrone G, Pernpruner S, *et al.* (1987) Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **60**: 1239-1245.

Lopez AD & Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* **4**: 1241-1243.

Lotufo PA (1998) [Premature mortality from heart diseases in Brazil. A comparison with other countries]. *Arq Bras Cardiol* **70**: 321-325.

Lowel H, Dobson A, Keil U, *et al.* (1993) Coronary heart disease case fatality in four countries. A community study. The Acute Myocardial Infarction Register Teams of Auckland, Augsburg, Bremen, FINMONICA, Newcastle, and Perth. *Circulation* **88**: 2524-2531.

MacDougall JD, Gibala MJ, Tarnopolsky MA, MacDonald JR, Interisano SA & Yarasheski KE (1995) The time course for elevated muscle protein synthesis following heavy resistance exercise. *Can J Appl Physiol* **20**: 480-486.

Maggioni AP, Zuanetti G, Franzosi MG, *et al.* (1993) Prevalence and prognostic significance of ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction in the fibrinolytic era. GISSI-2 results. *Circulation* **87**: 312-322.

Malliani A (1982) Cardiovascular sympathetic afferent fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **94**: 11-74.

Malliani A & Montano N (2002) Emerging excitatory role of cardiovascular sympathetic afferents in pathophysiological conditions. *Hypertension* **39**: 63-68.

Malliani A, Schwartz PJ & Zanchetti A (1969) A sympathetic reflex elicited by experimental coronary occlusion. *Am J Physiol* **217**: 703-709.

Malliani A, Peterson DF, Bishop VS & Brown AM (1972) Spinal sympathetic cardiocardiac reflexes. *Circ Res* **30**: 158-166.

Malliani A, Parks M, Tuckett RP & Brown AM (1973) Reflex increases in heart rate elicited by stimulation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers in the cat. *Circ Res* **32**: 9-14.

Mancia G (1990) Sympathetic activation in congestive heart failure. *Eur Heart J* **11 Suppl A**: 3-11.

Mancia G, Seravalle G, Giannattasio C, Bossi M, Preti L, Cattaneo BM & Grassi G (1992) Reflex cardiovascular control in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **69**: 17G-22G; discussion 22G-23G.

Marcopito LF & Berlin JA (1998) A method for calculating age-weighted death proportions for comparison purposes. *Int J Epidemiol* **27**: 1044-1052.

Mark AL (1995) Sympathetic dysregulation in heart failure: mechanisms and therapy. *Clin Cardiol* **18**: 13-8.

McAlpine HM & Cobbe SM (1988) Neuroendocrine changes in acute myocardial infarction. *Am J Med* **84**: 61-66.

McAlpine HM, Morton JJ, Leckie B, Rumley A, Gillen G & Dargie HJ (1988) Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction. *Br Heart J* **60**: 117-124.

McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, *et al.* (2013) The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun* **4**: 2395.

Meller ST & Gebhart GF (1992) A critical review of the afferent pathways and the potential chemical mediators involved in cardiac pain. *Neuroscience* **48**: 501-524.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM & Vassallo DV (1990) Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res* **24**: 748-753.

Minisi AJ & Thames MD (1991) Activation of cardiac sympathetic afferents during coronary occlusion. Evidence for reflex activation of sympathetic nervous system during transmural myocardial ischemia in the dog. *Circulation* **84**: 357-367.

Murakami H, Liu JL & Zucker IH (1996) Blockade of AT1 receptors enhances baroreflex control of heart rate in conscious rabbits with heart failure. *Am J Physiol* **271**: R303-309.

Murakami H, Liu JL & Zucker IH (1997) Angiotensin II blockade [corrected] enhances baroreflex control of sympathetic outflow in heart failure. *Hypertension* **29**: 564-569.

Nalivaiko E, Antunes VR & Paton JF (2010) Control of cardiac contractility in the rat working heart-brainstem preparation. *Exp Physiol* **95**: 107-119.

Narkiewicz K, Pesek CA, van de Borne PJ, Kato M & Somers VK (1999) Enhanced sympathetic and ventilatory responses to central chemoreflex activation in heart failure. *Circulation* **100**: 262-267.

Narkiewicz K, van de Borne PJ, Montano N, Dyken ME, Phillips BG & Somers VK (1998) Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* **97**: 943-945.

Nerdrum T, Baker DG, Coleridge HM & Coleridge JC (1986) Interaction of bradykinin and prostaglandin E1 on cardiac pressor reflex and sympathetic afferents. *Am J Physiol* **250**: R815-822.

Neto FR, Brasil JC & Antonio A (1974) Bradykinin-induced coronary chemoreflex in the dog. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **283**: 135-142.

Ninomiya I, Matsukawa K, Honda T, Nishiura N & Shirai M (1986) Cardiac sympathetic nerve activity and heart rate during coronary occlusion in awake cats. *Am J Physiol* **251**: H528-537.

Pantridge JF, Webb SW & Adgey AA (1981) Arrhythmias in the first hours of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* **23**: 265-278.

Paton JF (1996) A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**: 63-68.

Paton JF & Kasparov S (1999) Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - a microinjection study in the rat. *J Physiol* **521 Pt 1**: 213-225.

Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, *et al.* (2013) The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension* **61**: 5-13.

Persson PB (1991) History of arterial baroreceptor reflexes. In: Baroreceptor Reflexes. Edited by: Persson PB and Kirchheim, Springer-Verlag, pp 1-8.

Peterson DF & Brown AM (1971) Pressor reflexes produced by stimulation of afferent fibers in the cardiac sympathetic nerves of the cat. *Circ Res* **28**: 605-610.

Petersson M, Friberg P, Eisenhofer G, Lambert G & Rundqvist B (2005) Long-term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* **26**: 906-913.

Polson JW, Dampney RA, Boscan P, Pickering AE & Paton JF (2007) Differential baroreflex control of sympathetic drive by angiotensin II in the nucleus tractus solitarii. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**: R1954-1960.

Ponikowski P, Chua TP, Piepoli M, *et al.* (1997) Augmented peripheral chemosensitivity as a potential input to baroreflex impairment and autonomic imbalance in chronic heart failure. *Circulation* **96**: 2586-2594.

Reid IA (1992) Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol* **262**: E763-778.

Rosenshtraukh L, Danilo P, Jr., Anyukhovskiy EP, *et al.* (1994) Mechanisms for vagal modulation of ventricular repolarization and of coronary occlusion-induced lethal arrhythmias in cats. *Circ Res* **75**: 722-732.

Rundqvist B, Elam M, Bergmann-Sverrisdottir Y, Eisenhofer G & Friberg P (1997) Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. *Circulation* **95**: 169-175.

Schwartz PJ, Zaza A, Pala M, Locati E, Beria G & Zanchetti A (1988) Baroreflex sensitivity and its evolution during the first year after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **12**: 629-636.

Sigurdsson A, Held P & Swedberg K (1993) Short- and long-term neurohormonal activation following acute myocardial infarction. *Am Heart J* **126**: 1068-1076.

Singh N, Mironov D, Armstrong PW, Ross AM & Langer A (1996) Heart rate variability assessment early after acute myocardial infarction. Pathophysiological and prognostic correlates. GUSTO ECG Substudy Investigators. Global Utilization of Streptokinase and TPA for Occluded Arteries. *Circulation* **93**: 1388-1395.

Spyer KM (1990) The central nervous organization of reflex circulatory control. In: Central Regulation of Autonomic Functions. Edited by: Loewy AD and Spyer KM, Oxford University Press, pp 168-188.

Staszewka-Barczak J, Ferreira SH & Vane JR (1976) An excitatory nociceptive cardiac reflex elicited by bradykinin and potentiated by prostaglandins and myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* **10**: 314-327.

Sun SY, Wang W, Zucker IH & Schultz HD (1999a) Enhanced peripheral chemoreflex function in conscious rabbits with pacing-induced heart failure. *J Appl Physiol* (1985) **86**: 1264-1272.

Sun SY, Wang W, Zucker IH & Schultz HD (1999b) Enhanced activity of carotid body chemoreceptors in rabbits with heart failure: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* (1985) **86**: 1273-1282.

Thames MD, Kinugawa T, Smith ML & Diberner-Dunlap ME (1993) Abnormalities of baroreflex control in heart failure. *J Am Coll Cardiol* **22**: 56A-60A.

Thames MD, Klopfenstein HS, Abboud FM, Mark AL & Walker JL (1978) Preferential distribution of inhibitory cardiac receptors with vagal afferents to the inferoposterior wall of the left ventricle activated during coronary occlusion in the dog. *Circ Res* **43**: 512-519.

Thoren PN (1976) Activation of left ventricular receptors with nonmedullated vagal afferent fibers during occlusion of a coronary artery in the cat. *Am J Cardiol* **37**: 1046-1051.

Tu H, Zhang L, Tran TP, Muelleman RL & Li YL (2010) Reduced expression and activation of voltage-gated sodium channels contributes to blunted baroreflex sensitivity in heart failure rats. *J Neurosci Res* **88**: 3337-3349.

Uchida Y & Murao S (1974a) Bradykinin-induced excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers. *Jpn Heart J* **15**: 84-91.

Uchida Y & Murao S (1974b) Potassium-induced excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol* **226**: 603-607.

Uchida Y & Murao S (1975) Acid-induced excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol* **228**: 27-33.

Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS, Jr., Foreman RD & Schwartz PJ (1991) Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res* **68**: 1471-1481.

Wallin BG (1993) Assessment of sympathetic mechanisms for recordings of postganglionic efferent nerve traffic. In: Hainsworth R, Mark AL, eds. *Cardiovascular Reflex Control in Health and Disease*. Philadelphia, Pa: Saunders; 63-93.

Wang W & Ma R (2000) Cardiac sympathetic afferent reflexes in heart failure. *Heart Fail Rev* **5**: 57-71.

Wang W, Chen JS & Zucker IH (1991) Carotid sinus baroreceptor reflex in dogs with experimental heart failure. *Circ Res* **68**: 1294-1301.

Wang W, Schultz HD & Ma R (1999) Cardiac sympathetic afferent sensitivity is enhanced in heart failure. *Am J Physiol* **277**: H812-817.

Wang WZ, Gao L, Wang HJ, Zucker IH & Wang W (2008) Interaction between cardiac sympathetic afferent reflex and chemoreflex is mediated by the NTS AT1 receptors in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**: H1216-H1226.

Webb SW, Adgey AA & Pantridge JF (1972) Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *Br Med J* **3**: 89-92.

Yoshimura R, Sato T, Kawada T, *et al.* (2000) Increased brain angiotensin receptor in rats with chronic high-output heart failure. *J Card Fail* **6**: 66-72.

Zheng ZJ, Croft JB, Giles WH & Mensah GA (2001) Sudden cardiac death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation* **104**: 2158-2163.

Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF & Machado BH (2008) Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* **586**: 3253-3265.

Zucker IH, Wang W & Brandle M (1993) Baroreflex abnormalities in congestive heart failure. *News Physiol Sci* **8**: 87-90.

Zucker IH, Wang W, Brandle M, Schultz HD & Patel KP (1995) Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* **37**: 397-414.

Zucker IH, Schultz HD, Patel KP, Wang W & Gao L (2009) Regulation of central angiotensin type 1 receptors and sympathetic outflow in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H1557-1566.

8. ANEXO