

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

JOÃO VIANNEI EFFTING JUNIOR

**INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO AUTONÔMICA SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE CORAÇÃO ISOLADO DE RATO NA
PREPARAÇÃO DE LANGENDORFF EM CIRCUITO FECHADO**

**Mogi das Cruzes – SP
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

JOÃO VIANNEI EFFTING JUNIOR

**INFLUÊNCIA DA MODULAÇÃO AUTÔNOMICA SOBRE A
FUNCIONALIDADE DE CORAÇÃO ISOLADO DE RATO NA
PREPARAÇÃO DE LANGENDORFF EM CIRCUITO FECHADO**

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes, para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

**Mogi das Cruzes – SP
2008**

Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade de Mogi das Cruzes – SP
2008

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO MESTRADO
 EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

No dia 29/02/08 o candidato *João Viannei Effting Junior*, após realizar os créditos exigidos, ser aprovado no exame de Proficiência em Inglês, e no exame de Qualificação, apresentou o trabalho "*Influência da modulação autonômica sobre a funcionalidade de coração isolado de rato na preparação de Langendorff em circuito fechado*" para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Os membros da banca consideram o candidato:

Dr. Afonso Caricati Neto
 Dr. Daniel Gustavo Goroso
 Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy

Conceito

APROVADO

Aprovado

APROVADO


 Dr. Afonso Caricati Neto
 Universidade Federal de São Paulo


 Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy
 Universidade de Mogi das Cruzes


 Dr. Daniel Gustavo Goroso
 Universidade de Mogi das Cruzes

DEDICATÓRIA

*Ao contemplar a criação somos constantemente estimulados a
descobrir, aprender, ensinar e recriar.*

*O amor, na sua forma mais pura e elevada é o promotor de todas
as formas de conhecimento.*

*Por isso dedico esse trabalho de pesquisa a quem é para mim o meu maior amor,
minha família Larissa e Yohan Fernando.*

AGRADECIMENTOS

“Ser grato é um grande atributo da alma humana. A gratidão é um sentimento que quando cultivado credencia os seres para viver em um plano que não pode ser vivido sem a presença de tão nobre sentimento”.

Por isso agradeço,

A Deus, que me fez acreditar que este caminho poderia ser percorrido e que em nenhum momento me desamparou.

Aos meus Pais *João e Leonida Effting*, que me deram a vida e que me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um *obrigado*. A vocês, que iluminaram os meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheio de esperanças, não bastaria um *muito obrigado*. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão de que em que muitos dias importantes eu não pude estar presente, não bastaria um *muitíssimo obrigado*. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que acontece agora, quando procurei arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Emoção esta, que já mais seria traduzida em palavras...

A minha querida irmã *Tânia Regina*, a minha sobrinha *Larissa*, meu afilhado *João Carlos* e meu cunhado *Raphael Dippol*, por todas as experiências de amizade que partilhamos na vida familiar e por todo apoio.

A *Larissa* a minha namorada, esposa, amiga, companheira e cúmplice por sua permanente tolerância, compreensão e respeito. Seus abraços, olhares carinhosos e palavras de conforto foram fundamentais nesta trajetória.

Ao meu filho *Yohan Fernando*, recém concebido, que ao repartir consigo meu coração, o fez ainda maior, nele despertando imenso carinho, capaz de originar em meu interior um fascinante desejo de ultrapassar as barreiras impostas pela vida.

Cabe aqui um agradecimento de honra:

Há pessoas que nos falam e não ouvimos. Há outros que nos tocam e não sentimos. Mas há aqueles que simplesmente vivem e nos marcam para sempre...

Inabalável nas suas convicções, profundo nas suas intenções e puro nas suas ações, o orientador *Prof. Dr. Carlos Marcelo Gurjão de Godoy* é um exemplo de vida. Testemunho de alegria, determinação e força. Persistente como poucos, sabe contornar obstáculos e vencer desafios, retirando dos momentos de desilusão uma lição de vida e uma oportunidade de crescimento. Nunca esquecendo a sua força interior e nobreza de caráter, entregando-se ao que faz de alma e coração.

Meu muito obrigado pela amizade que encontrei em você, pela confiança disposta, por toda ajuda e por despertar dentro de mim a ciência, me ajudando assim a ser um profissional e além de tudo uma pessoa melhor.

Sou muito grato ao *Prof. Dr. Afonso Caricati Neto* que caminhando junto comigo nessa árdua etapa de aprender a fazer pesquisa. Com suas oportunas observações, com seu tino de pesquisador soube dar a um conjunto de expectativas, dúvidas e incertezas subsídios para a feliz concretização desse trabalho.

Seria injusto se neste espaço deixasse de agradecer a *Prof^a. Ms. Rosiane Dantas Pacheco* e o *Prof. Ms. Diego Basile Colugnati*, pois foi através deles que dei os primeiros passos para concretizar este trabalho.

Preciso aqui agradecer de forma simples, porém verdadeira a Kleber Magalães, José Augusto, Pedro Braga, Sergio Gomes, José Gustavo, Enio Vasques, Mauricio Marques, Frederico Vasconcelos, Douglas Moreira, Paulo Gomes, Adriessa dos Santos, Ivan Vivas, Juliana Duarte, Marília Ferreira, Terezinha Lorena enfim a todos os colegas, companheiros de caminhada de diferentes partições que sempre me apresentaram um aporte positivo para a conquista do objetivo final.

A todos o meu **MUITO OBRIGADO!**

EPÍGRAFE

*"A ciência serve para nos dar uma
idéia de quão extensa é a nossa ignorância".*

Félicité Robert de Lamennai

Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade de Mogi das Cruzes – SP
2008

RESUMO

Foi realizado em nosso laboratório modificações no método tradicional de Langendorff para adequadamente re-circular a solução que perfunde o coração. Este tipo de perfusão, denominada “Fechada”, minimiza, por exemplo, gastos excessivos em testes com fármacos de alto custo. Contudo, apesar das vantagens citadas para a circulação fechada, estudos anteriores realizados no mesmo laboratório, mostram que, diferente do método tradicional de perfusão descrito por Langendorff, no qual o coração tem seus parâmetros funcionais mantidos estáveis por aproximadamente 120 minutos, no sistema de perfusão em circuito fechado com baixo volume de solução (100 ml), estes parâmetros decaem significativamente em 60 min. Levantamos a hipótese de que uma ou mais substâncias cardiodepressoras estavam sendo liberadas pelo próprio coração na solução circulante, sendo estas possivelmente relacionadas ao sistema nervoso autonômico intrínseco cardíaco. Propusemos então neste trabalho avaliar fatores associados a este sistema que poderiam estar envolvidos na queda dos parâmetros cardíacos de coração isolado em montagem de Langendorff em circuito fechado com baixo volume circulante (100ml). Para isso, duas abordagens foram realizadas: 1^a) Avaliamos a funcionalidade de corações perfundidos em circuito fechado (anteriormente perfundido em circuito aberto) com a solução proveniente de outro coração que estava em circuito fechado e com sua funcionalidade já comprometida; 2^a) Avaliamos o efeito de agonistas e antagonistas do sistema nervoso autonômico em diferentes grupos experimentais e contrastamos com os parâmetros dos grupo controle em circuito fechado com volume circulante de 100 ml (CCF). Em ambas abordagens foram quantificados três parâmetros fisiológicos do coração: frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo da perfusão cardíaca. Os resultados deste estudo mostram que: (1) a(s) substância(s) que provoca(m) a queda dos parâmetros cardíacos é (são) liberada(s) pelo próprio coração e mantém-se presente na solução de perfusão, (2) a queda da funcionalidade cardíaca é mediada de maneira importante pelo sistema colinérgico muscarínico pois, em 30 minutos, o antagonista seletivo colinérgico muscarínico (atropina) atenua em aproximadamente 70% a queda dos parâmetros cardíacos, em relação ao CCF. A estimulação com anti-colinesterázico (Fisostigmina) e com agonista seletivo (carbacol) intensifica, em relação ao CCF, a queda dos parâmetros também em 30 minutos; (3) o sistema β -adrenérgico cardíaco também tem um papel importante na manutenção dos parâmetros avaliados pois, em 20 minutos, o agonista seletivo (isoproteronol) atenuou, em relação ao CCF, a queda dos parâmetros, enquanto que o bloqueio colinérgico muscarínico pelo antagonista seletivo (propranolol) intensificou a queda destes parâmetros. Considerando os resultados concluímos que: 1) A substância que causa a queda da funcionalidade de corações isolados em circuito fechado com baixo volume circulante está na solução circulante; 2) A queda da funcionalidade de corações isolados, nestas condições experimentais, é mediada de maneira importante por mecanismos colinérgicos muscarínicos acionados por substância intrínseca do coração (provavelmente acetilcolina) liberada na solução circulante; 3) O sistema β -adrenérgico tem responsabilidade direta sobre a manutenção da funcionalidade cardíaca de corações isolados de ratos com baixo volume circulante, provavelmente acionado pelo seu neurotransmissor (noradrenalina). 4) A abordagem utilizada, ou seja, a de fazer medições fisiológicas do coração em preparação de Langendorff, em circuito fechado, com diferentes volumes circulantes, constitui-se ferramenta metodológica útil para contribuir com o aprofundamento do estudo do papel deste tipo de modulação sobre o coração.

Palavras-chave: Preparação de Langendorff, coração isolado, modulação autonômica, antagonistas autonômicos, agonistas autonômicos.

ABSTRACT

It was carried out in our laboratory modifications in the traditional method of Langendorff to adequately recirculate the heart perfusion solution. This type of perfusion, so-called "Closed Circulation" minimizes, for example, expenses in tests with high cost drugs. However, despite the Closed Circulation advantages, the previous studies carried out in the laboratory show that, distinct of the traditional method of perfusion described by Langendorff (Opened Circulation), in which the heart keeps its functional parameters stable for 120 min., in Closed Circulation System, with low circulating volume (100 ml), these parameters decay significantly in 60 min. We supposed that one or more depressing cardiac substances were released by the own heart in the circulation solution, being these substances possibly related to the intrinsic cardiac autonomic nervous system. Taking this into account, we have proposed to evaluate factors associated to this system that could be involved in the decay of the cardiac parameters of isolated heart in Closed Circulation (100ml). Two approaches have been carried out: 1) We evaluate cardiac functionality in Closed Circulation (previously perfusion in Opened Circulation) with the solution taken from other heart that, in turn, was in Closed Circulation and already with its functionality compromised; 2) We evaluate the effect of agonists and antagonists of the autonomic nervous system in different experimental groups and contrasted them with the parameters of the control group in closed circuit with circulating volume of 100 ml (CCC). In both approaches its has been quantified three physiological parameters of the heart: cardiac frequency, left ventricular pressure and cardiac perfusion flow. The results show that: (1) the substance (or substances) that provokes the decaying of the cardiac parameters is released by the own heart and, it (or they) remained present in the perfusion solution, (2) the cardiac functionality decaying is importantly mediated by the cholinergic muscarinic system considering that, in 30 min., the selective colinergic muscarinic antagonist (atropine) attenuates approximately in 70% the cardiac parameters decaying, in relation to the CCC. The stimulation with anticholinesterasic (physostigmine) and selective cholinergic agonist (carbachol) intensifies, in relation to the CCC, the decaying of the parameters also in 30 min.; (3) the β -adrenergic cardiac system also plays an important role in the parameter maintenances. In 20 min., the selective adrenergic agonists (isoproteronol) attenuated, in relation to the CCC, the parameter decaying, whereas the cholinergic muscarinic blockade by the selective antagonist (propranolol) intensified the decaying of the parameters. Considering the results we conclude that: 1) the substance that cause the isolated heart functionality decaying in Closed Circulation condition is in the circulating solution; 2) the functionality decaying of isolated hearts, in these experimental conditions, is importantly mediated by cholinergic muscarinic mechanisms activated by intrinsic heart substance (probably acetylcholine) released in the circulating solution; 3) the β -adrenergic system has direct role on the maintenance of the cardiac functionality of isolated rat hearts with low circulating volume, probably due to the activation of its neurotransmitter (noradrenalin). 4) the approach of performing physiological measurements of the heart in Langendorff preparation in Closed Circulation with different circulating volumes, consists in a useful methodological tool for the study of the heart autonomic modulation.

Keywords: Langendorff preparation; isolated heart, autonomic modulation, autonomic antagonists, Autonomic agonists.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “ <i>Aberto</i> ” e “ <i>Fechado 100ml</i> ” e o consumo de glicose pelo coração (D) ao longo do tempo de experimento (obtidos de NECCHI – JR, 2006).....	22
Figura 2	Estrutura anatômica do coração e a seqüência do fluxo sanguíneo pelas câmaras cardíacas.....	25
Figura 3	Ilustração da inervação cardíaca pelo sistema nervoso autonômico.....	30
Figura 4	Ilustração da montagem de Langendorff completa em circuito aberto.....	40
Figura 5	Ilustração da montagem experimental de Langendorff em circuito fechado.....	41
Figura 6	Gráfico de calibração do transdutor de pressão.....	47
Figura 7	Registros A – ECG (amplificado 10.000x) e, B – da pressão ventricular (amplificado 10x) de coração de rato isolado em montagem de Langendorff.....	49
Figura 8	Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) no grupo “ <i>Troca de Solução</i> ”, ao longo do tempo de experimento.....	51
Figura 9	Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “ <i>Aberto</i> ”, “ <i>Fechado 100ml</i> ” e “ <i>Atropina</i> ”, ao longo do tempo de experimento.....	52
Figura 10	Gráfico ilustrando o comportamento médio (erro padrão) da (A) Frequência Cardíaca, (B) Pressão Ventricular Esquerda e (C) Fluxo da Perfusão nos grupos “ <i>Fechado 100ml</i> ”, “ <i>Fisostigmina</i> ” (e “ <i>Carbacol</i> ”, ao longo do tempo de experimento.....	54
Figura 11	Gráfico ilustrando o efeito do tempo sobre a Frequência Cardíaca média (A), a Pressão Ventricular Esquerda média (B) e o Fluxo da Perfusão médio (C) nos grupos “ <i>Aberto</i> ”, “ <i>Atropina</i> ”, “ <i>Fechado 100ml</i> ”, “ <i>Fisostigmina</i> ” e “ <i>Carbacol</i> ” durante o tempo de experimento.....	55
Figura 12	Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “ <i>Fechado 100ml</i> ” e “ <i>Propranolol</i> ” ao longo do tempo de experimento.....	57
Figura 13	Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “ <i>Aberto</i> ”, “ <i>Isoproterenol e Atropina</i> ”, “ <i>Isoproterenol</i> ” e “ <i>Fechado 100ml</i> ”, ao longo do tempo de experimento.....	58

- Figura 14 Gráfico ilustrando o efeito do tempo sobre a Frequência Cardíaca média (A), a Pressão Ventricular Esquerda média (B) e o Fluxo da Perfusão médio (C) nos grupos “Aberto”, “Isoproteronol e Atropina”, “Isoproteronol”, “Fechado 100ml”, e “Propranolol”, durante o tempo de experimento..... 61
- Figura 15 Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “DMPP”, “DMPP e Atropina” e “Fechado 100ml”, ao longo do tempo de experimento..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Freqüência cardíaca (bpm) média (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.....	79
Tabela 2	Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.....	80
Tabela 3	Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.....	80
Tabela 4	Freqüência cardíaca (bpm) média (erro padrão) dos grupos “DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.....	81
Tabela 5	Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) dos grupos “ DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.....	81
Tabela 6	Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) dos grupos “DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.....	82
Tabela 7	Freqüência cardíaca (bpm) média (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.....	82
Tabela 8	Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.....	83
Tabela 9	Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.....	83
Tabela 10	Média com erro padrão da resistência periférica cardíaca dos grupos “Aberto”, “Fechado”, “Atropina”, “Fisostigmina” e “Carbacol” durante todos os experimentos.....	85
Tabela 11	Média com erro padrão da resistência periférica cardíaca dos grupos “Propranolol”, “Isoproterenol”, “Isoproterenol e Atropina”, “DMPP” e “DMPP e Atropinal” durante todos os experimentos.....	85

LISTA DE ABREVIACÕES

AC	Adenilato cilcase
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Ag	Prata
Ag/Cl	Prata Cloretada
bpm	Batimentos por minuto
C ₁	Coração 1
C ₂	Coração 2
Ca ⁺²	Íons de Cálcio
°C	Grau Celsius
CEMEA	Comissão de Ética em Manipulação e Experimentação Animal
Cl ⁻	Cloro
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMPP	Dimetilfenilpiperazínio
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência Cardíaca
FP	Fluxo da Perfusão
G _i	Proteína G Inibitória
G _s	Proteína G Estimulatória
Hz	Hertz
K ⁺	Potássio
K-H	Krebs-Henseleit
L ₂	Segundo Segmento Medular Lombar
LEC	Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca
LIB	Laboratório de Instrumentação Biomédica
mM	Milimolar

M ₂	Receptor Muscarínico Subtipo 2
mmHg	Milímetros de Mercúrio
Min	Minuto
mAChR	Receptor de Acetilcolina Muscarínico
ml	Mililitros
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Íons de Sódio
NAV	Nódulo Átrio Ventricular
NO	Oxido Nítrico
NSA	Nódulo Sinoatrial
NPT	Núcleo de Pesquisa Tecnológica
O ₂	Oxigênio
PA	Potencial de Ação
PKA	Proteína Kinase A
PTX	Toxina de Pertusis
PVE	Pressão Ventricular Esquerda
SNP	Sistema Nervos Parassimpático
SNS	Sistema Nervos Simpático
T ₁	Primeiro Segmento Medular Torácico
T ₅	Quinto Segmento Medular Torácico
UMC	Universidade de Mogi das Cruzes
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 BREVE HISTÓRICO DA TÉCNICA DE LANGENDORFF.....	18
1.2 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	23
2.1.1 Objetivos específicos.....	23
3 ASPECTOS TEÓRICOS.....	24
3.1 ANATOMIA FUNCIONAL E ELETROFISIOLOGIA CARDÍACA.....	24
3.1.1 Avaliação das propriedades Cardíacas.....	27
3.2 ANATOMIA DA INERVAÇÃO AUTONÔMICA NO CORAÇÃO....	28
3.2.1 Controle Cardíaco Simpático.....	31
3.2.2 Controle Cardíaco Parassimpático.....	32
3.2.2.1 Regulação parassimpática inibitória.....	33
3.2.2.2 Regulação parassimpática estimulatória.....	35
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 ABORDAGEM GERAL.....	37
4.2 ANIMAIS.....	38
4.3 SOLUÇÃO FISIOLÓGICA.....	38
4.4. PREPARAÇÃO BIOLÓGICA.....	38
4.5. MONTAGEM EXPERIMENTAL.....	39
4.6 FÁRMACOS.....	42
4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.7.1 Para determinar se a substância que compromete a funcionalidade cardíaca é liberada pelo próprio coração e	

permanece na solução circulante	42
4.7.2 Para avaliar a funcionalidade cardíaca ora sobre o efeito do bloqueio e ora sobre o efeito da estimulação do sistema colinérgico muscarínico	43
4.7.3 Para avaliar a funcionalidade cardíaca ora sobre o efeito do bloqueio e ora sobre o efeito da estimulação do sistema β-adrenérgico	43
4.7.4 Para avaliar a integralidade pré sináptica do sistema nervoso autonômico	44
4.8 INSTRUMENTAÇÃO	45
4.8.1 Calibrações	46
4.9 PARÂMETROS AVALIADOS	47
5 RESULTADOS	50
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO DA TÉCNICA DE LANGENDORFF

Em 1898, um médico fisiologista alemão conhecido como Oscar Langendorff (1853-1909) publicou trabalho intitulado “*Untersuchungen am überlebenden Säugertierherzen*” na revista *Pflügers Archive für der Gesamten Physiologie*, no qual descreveu um método para perfundir e manter vivo um coração isolado de mamífero (ZIMMER, 1998). Desde então, numerosos estudos que levam a importantes descobertas sobre fisiologia e farmacologia cardíaca foram desenvolvidos utilizando a técnica de perfusão de corações isolados de mamíferos descrita por Langendorff em 1895 (HILL *et al.*, 2005).

O próprio Langendorff com o uso do método realizou grandes contribuições para a fisiologia cardíaca. Isto inclui a demonstração de que o coração recebe seus nutrientes e oxigênio do sangue através da circulação coronariana e que mudanças nesta circulação reflete diretamente na função mecânica do coração (LANGENDORFF, 1898). Langendorff confirmou também as observações precedentes a respeito do efeito cronotrópico negativo pela estimulação do nervo vago e da administração dos agonistas muscarínicos, assim como o efeito cronotrópico positivo da atropina. Foi ele quem também observou que o cloreto de potássio provoca ataque cardíaco (LANGENDORFF, 1898; TAEGTMEYER, 1995). Apesar de sua descoberta fundamental a respeito da circulação coronariana não ser extensivamente mencionada, ela é a porta para a nova era da fisiologia cardíaca. Isso pode ser ilustrado por alguns exemplos selecionados, como segue.

Em 1899, Coats demonstrou que o sangue usado originalmente por Langendorff para perfundir os corações poderia ser substituído por um meio salino enriquecido com glicose. Sua descoberta foi uma das primeiras etapas seguidas por Krebs e Henseleit para elaborar a composição da solução de perfusão de tecidos de mamíferos (TAEGTMEYER, 1995).

Bayliss, em 1902, mostrou que as artérias têm a característica de distensão plástica esticando-se rapidamente, o que foi a base para o nosso conhecimento sobre autorregulação miogênica, que posteriormente foi investigada por vários pesquisadores nas circulações de outros órgãos (DORING & DEHNERT, 1987). Schaeffer, em 1904, publicou as descobertas a respeito dos nervos vasomotores das artérias coronárias, assim como os efeitos desta inervação que foi também examinado por Wiggers em 1909 (GRANGER, 1998).

Foi Langendorff e Bornstein em 1906 que reconheceram que uma sístole prematura que ocorre no período refratário absoluto do coração está seguida por uma batida cuja força de contração apresenta maior amplitude do que qualquer outra sístole precedente (DORING & DEHNERT, 1987). Este fenômeno foi chamado de potencial pós-extrasístole, embora ele não seja típico para todas as espécies, ocorrendo somente nos seres humanos, camundongos e ratos. Nestes corações, a distribuição Ca^{+2} intracelular proveniente do retículo sarcoplasmático domina o efluxo de Ca^{+2} mediado pela bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. Esta descoberta, feita com o uso da preparação de Langendorff, foi a base subsequente para pesquisadores descobrirem importantes informações da função sistólica cardíaca em humanos (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007).

Em 1914, Ernest Starling, usando uma preparação de coração pulmão (heart-lung) isolado junto com um instrumento para monitorar o volume dos ventrículos, mostrou que o volume contido no ventrículo tinha uma direta relação no volume diastólico final (PATTERSON & STARLING, 1914; STARLING & VISSCHER, 1927; GRANGER, 1998; ZIMMER, 2000). Starling executou a maioria dos trabalhos experimentais que relaciona a ejeção cardíaca à pressão de enchimento ventricular. Usou a preparação de coração pulmão (heart-lung) de cão e mostrou que quando o fluxo venoso foi aumentado pela elevação da pressão venosa, o volume diastólico cardíaco e o fluxo normal também aumentaram, sendo aumentado o comprimento diastólico da fibra em ambos os casos (ZIMMER, 2000).

De fato, poucos modelos experimentais de órgãos isolados foram usados tão extensivamente quanto a preparação de coração isolado de Langendorff (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007). Esta técnica, que consiste basicamente na perfusão retrógrada do coração via canulação da artéria aorta, foi aplicada a princípio por fisiologistas, bioquímicos e morfologistas para o estudo da biologia do coração. Posteriormente, foi também utilizada por farmacologistas para testar a ação de diferentes drogas cardiovasculares sobre a vascularização coronariana, contração do músculo e frequência cardíaca (ZIMMER, 1998). Hoje, diversos pesquisadores cardiovasculares ainda utilizam esta técnica que proporciona diferentes maneiras de se investigar o coração (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007).

Entre outras aplicações, a técnica descrita por Langendorff é atualmente empregada em estudos do efeito de uma única alteração no gene e/ou na fisiologia do coração (TEVAEARAI *et al.*, 2002), assim como na investigação de novos meios terapêuticos de proteção cardíaca (DOBSAK *et al.*, 1999, WANG & TOKUNO *et al.*, 2002; OHNO *et al.*, 2003).

Contudo, existem algumas limitações no método, tais como ausência da influência humoral normal e da regulação nervosa, assim como o fluxo coronariano elevado e o edema durante a perfusão. Por outro lado, o impacto destas limitações é compensado pela vantagem de que muitas informações relevantes podem ser obtidas em virtude da simplicidade e elegância desta técnica. Além disso, os métodos de captação dos parâmetros biofísicos e bioquímicos foram melhorados com o passar das décadas, aumentou-se o número dos parâmetros que podem ser obtidos usando este método, as medidas são reproduzíveis e os custos para implementação desta técnica são relativamente baixos. Assim, estas vantagens predominam sobre suas limitações, fazendo desta uma ferramenta bastante útil na pesquisa cardiovascular e farmacológica (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007).

1.2 MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

Vários modelos experimentais de coração isolado têm sido propostos e modificados a partir da preparação de Langendorff, sendo ainda necessárias melhorias para um modelo ideal de estudos da função do coração (AN *et al.*, 2002). Considerando-se que no método tradicional de Langendorff a solução usada para perfundir o tecido cardíaco é descartada após a perfusão (circuito aberto), modificações têm sido feitas para adequadamente re-circular a solução que perfunde o coração. Este tipo de perfusão, denominada “*Fechada*”, minimiza, por exemplo, gastos excessivos em testes com fármacos de alto custo.

Contudo, apesar das vantagens citadas para a circulação fechada, estudos anteriores realizados no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca (LEC) na Universidade de Mogi das Cruzes (NECCHI-JR, 2006; NECCHI-JR *et al.*, 2006), mostram que, diferente da perfusão em circuito aberto, no qual o coração tem seus parâmetros funcionais mantidos estáveis por aproximadamente 120 minutos, no sistema de perfusão em circuito fechado com baixo volume de solução (100 ml), estes parâmetros decaem significativamente até 60 min. de perfusão (figura 1A, 1B e 1C). Estes resultados indicam, por si só, que investigações mais aprofundadas da funcionalidade do coração isolado em circuito fechado ainda são necessárias, principalmente considerando que este procedimento tem sido proposto inclusive para processos de transporte do coração para transplante (FITTON *et al.*, 2004). Assim, tendo em vista que: 1^o) a solução de perfusão, mesmo com baixo volume circulante mantém a concentração de glicose para a nutrição do tecido cardíaco (figura 1D); 2^o) o pH e o volume de solução mantêm-se essencialmente

constantes; 3^o) um dos parâmetros que decaiu significativamente na condição de circuito fechado (100 ml) foi a frequência cardíaca, levantamos a hipótese de que uma ou mais substâncias cardioativas estavam sendo liberadas pelo próprio coração na solução circulante, sendo estas possivelmente relacionadas aos nervos autonômico intra cardíacos. Propusemos então neste trabalho avaliar fatores associados a este sistema que poderiam estar envolvidos na queda dos parâmetros cardíacos de coração isolado em montagem de Langendorff em circuito fechado com baixo volume circulante (100ml).

A seguir, são apresentados os objetivos e os aspectos teóricos relacionados a este trabalho.

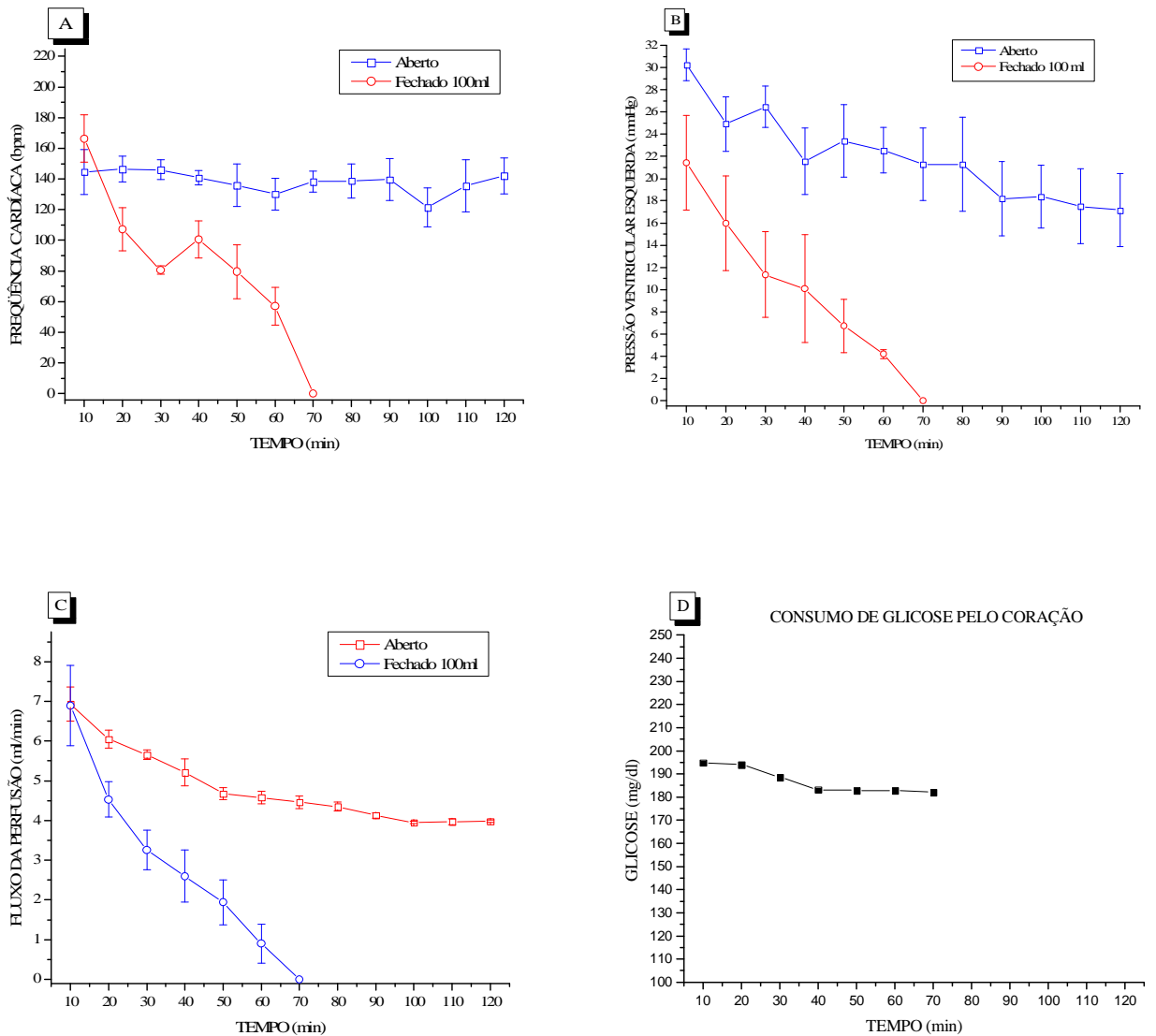


Figura 1: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “Aberto” (N=5) e “Fechado 100ml” (N=5) e o consumo de glicose pelo coração (D) ao longo do tempo de experimento (obtidos de NECCHI – JR, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da modulação autonômica sobre a resposta funcional do coração isolado de rato na preparação de Langendorff em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml).

2.1.2 Objetivos Específicos

- 1 – Testar se as substâncias que comprometem a resposta cardíaca são liberadas pelo próprio coração na solução circulante.
- 2 – Testar se a queda da resposta funcional do coração é mediada pelos neurotransmissores autonômicos.

3 ASPECTOS TEÓRICOS

3.1 ANATOMIA FUNCIONAL E ELETROFISIOLOGIA CARDÍACA

O coração compõe o sistema cardiovascular, considerado o principal sistema de integração do organismo (BERNE & LEVY, 2000). Ele é especializado em bombear sangue para os pulmões, órgãos e tecidos. O coração está localizado anatomicamente levemente à esquerda do centro do tórax, no sentido antero-posterior, sendo que seu ápice é acentuadamente deslocado para a esquerda (TORTORA & GRABAWSKI, 2002).

Nos mamíferos, a circulação se dá da seguinte forma: o sangue proveniente da circulação sistêmica chega ao átrio direito via veias cavas superior e inferior. Este sangue flui diretamente para o ventrículo direito com ajuda da contração do átrio direito. O ventrículo direito, por sua vez, inicia a denominada circulação pulmonar contraindo-se e bombeando o sangue para os pulmões, via artérias pulmonares, onde há a troca gasosa de CO₂ por O₂ (oxigenação sangüínea). O sangue oxigenado, proveniente dos pulmões, flui para o átrio esquerdo do coração, via veias pulmonares fechando a circulação pulmonar. O sangue oxigenado proveniente dos pulmões flui diretamente para o ventrículo esquerdo com auxílio da contração do átrio esquerdo. O ventrículo esquerdo, por sua vez, bombeia o sangue via artéria aorta, para todos os órgãos e tecidos do corpo, iniciando a chamada circulação sistêmica. A circulação sistêmica se fecha com o sangue retornando ao átrio direito do coração, via veias cavas superior e inferior (BABSKY *et al.*, 1989), vide figura 2.

Para que o coração possa exercer sua função mecânica de bombeamento do sangue arterial para todo o organismo é necessário que as células miocárdicas sejam ativadas eletricamente. De fato, a atividade elétrica do tecido cardíaco dispara sua atividade mecânica de bombeamento da seguinte forma: a atividade elétrica origina-se automaticamente no nódulo sino atrial (NSA) - também conhecido como marcapasso natural do coração - e, a partir dessa estrutura, propaga-se pelo miocárdio atrial atingindo o nódulo átrio ventricular (NAV), onde ganha o tecido especializado condutor dos ventrículos, representado pelo feixe de *His* e seus ramos e sub-ramos direito e esquerdo, terminando no sistema de *Purkinje* e ativando seqüencialmente toda a musculatura ventricular do ápice a base do coração.

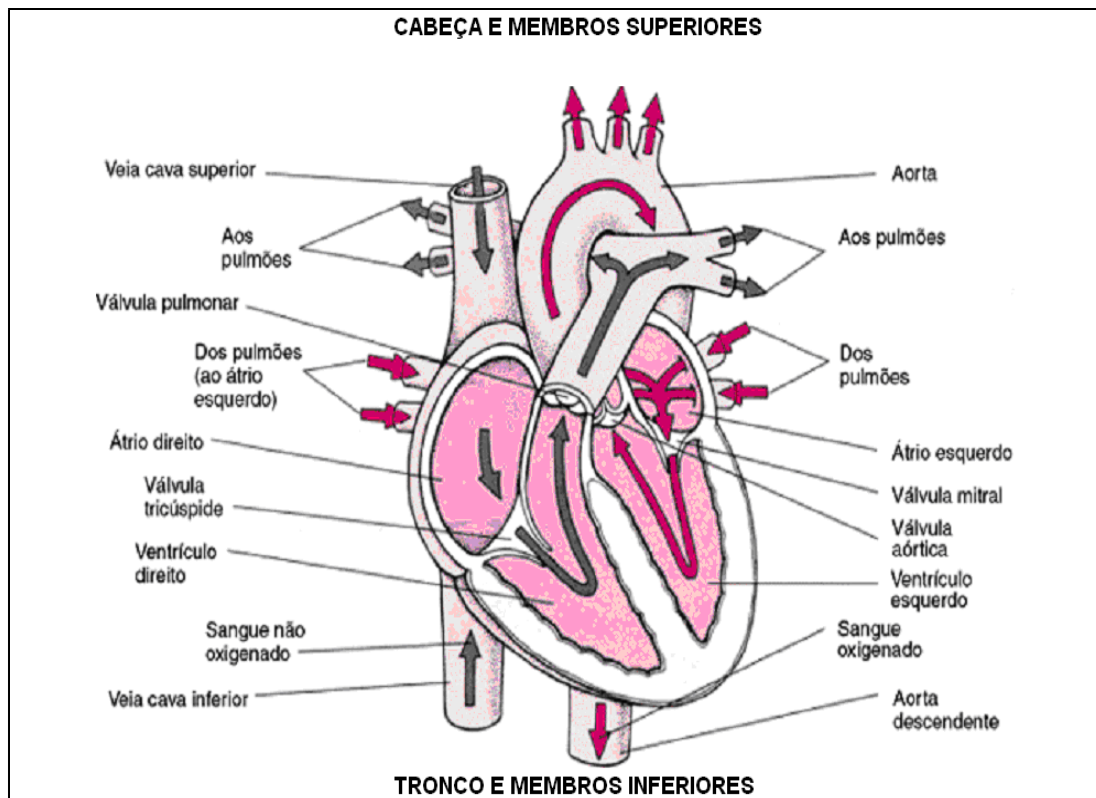


Figura 2: Estrutura anatômica do coração e a seqüência do fluxo sanguíneo pelas câmaras cardíacas indicado pelas setas, sendo que as setas pretas indicam sangue venoso e as vermelhas indicam o sangue arterial (modificado do GUYTON & HALL, 1997).

A ativação elétrica ventricular inicia-se pelo ramo direito do feixe de *His*, na região medial direita do septo interventricular, onde atinge as regiões medial e apical do ventrículo direito. Com pequeno retardo, o impulso elétrico conduzido pelo ramo esquerdo do feixe de *His*, ativa a região esquerda do septo interventricular, e a partir daí, as regiões médio-apical do ventrículo esquerdo. Finalmente, ativam-se as regiões basais ventriculares, pelo impulso conduzido pelos sub-ramos ântero-superiores direito e esquerdo. Este processo de disparo da atividade mecânica de bombeamento de sangue através da atividade elétrica gerada e conduzida no próprio coração guarda uma rigorosa organização espaço-temporal, de modo a prover a adequada funcionalidade do coração.

Em vista disso o desempenho da função de oferta e manutenção de um adequado fluxo sanguíneo tecidual pela bomba cardíaca está na dependência de quatro propriedades elementares, três eletrofisiológicas e uma mecânica. As propriedades eletrofisiológicas são especialmente próprias do tecido excitocondutor do coração e incluem o *automatismo*, a *condutibilidade* e a *excitabilidade*, enquanto que a propriedade mecânica é a *contractilidade*.

O automatismo é a propriedade que tem o coração de gerar sua própria ativação elétrica, o qual promove a contração rítmica das células miocárdicas contráteis. Todas as fibras pertencentes ao sistema condutor do coração são passíveis de auto-excitação, despolarizando espontaneamente. No entanto, nem todas as fibras possuem igual automatismo, o que acarreta em uma hierarquia no automatismo cardíaco. Com isso a fibra com capacidade de se despolarizar mais rapidamente irá assumir a função de marca-passo cardíaco, impondo a ritmicidade aos batimentos cardíaco, sendo este o papel assumido pelo NSA.

A condutibilidade é a propriedade de condução da ativação elétrica no tecido cardíaco. As células miocárdicas possuem característica funcional de condutibilidade, isto é, são capazes de transmitir um estímulo gerado em uma parte do coração para o resto do miocárdio. A propagação da atividade elétrica de uma célula miocárdica para outra se efetua por áreas de baixa resistência elétrica através das junções GAP. Nestes pontos, a intercomunicação entre os citoplasmas de células adjacentes faz com que a migração intracelular de íons se iguale nas células comunicantes, por isso, o potencial que se propaga ao longo de uma célula produz despolarização parcial da célula adjacente. Inicia-se então, uma propagação de potencial que estende o processo à novas fibras. O mecanismo prossegue até que toda a massa miocárdica seja despolarizada, conferindo ao coração sua propriedade de bomba.

A excitabilidade refere-se à propriedade que cada célula cardíaca tem de excitar-se em resposta a um estímulo elétrico, mecânico ou químico gerando a ativação elétrica que pode conduzir-se no tecido excitocondutor, ou gerar uma resposta contrátil, no miocárdio.

A contratilidade é a capacidade de contração do coração, que leva a ejeção de um determinado volume sanguíneo para os tecidos e ao esvaziamento do órgão, sendo que esta contração é uma resposta da fibra cardíaca a um estímulo. No coração tem-se dois momentos distintos de contrações. No primeiro ocorre a contração atrial (sístole atrial), depois a contração ventricular (sístole ventricular), fundamental para que o sangue flua e siga o seu curso normal.

A seguir abordagens técnicas para avaliação destas propriedades em pesquisas experimentais

3.1.1 Avaliação das propriedades Cardíacas

As propriedades funcionais cardíacas relatadas anteriormente são essenciais para o funcionamento cardiovascular. O trabalho em conjunto das propriedades cardíacas gera parâmetros mensuráveis e são importantes no diagnóstico de inúmeras patologias.

Três parâmetros bastante investigados em pesquisas experimentais são: a frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e o fluxo coronariano. Esses são parâmetros fundamentais tanto nas investigações sobre fisiologia cardíaca experimental como nas pesquisas farmacológicas.

A atividade elétrica do coração reflete a ação do músculo cardíaco durante a despolarização e repolarização celular em todo o ciclo cardíaco, determinando a sua frequência. Esta atividade quando captada reflete a soma da ativação elétrica das fibras miocárdicas, gerando assim um traçado (captado através de eletrodos) denominado de “eletrocardiograma” (ECG), que é tipicamente utilizado para diagnosticar arritmias, níveis anormais de eletrólitos (potássio) e anormalidades do sistema de condução elétrica cardíaca. Esta ativação elétrica consiste basicamente de “potenciais de ação” (PA), que é um fenômeno elétrico de despolarização do potencial de membrana propagável no tecido excitável. Os PA's são mediados pela abertura e fechamento de canais iônicos presentes na membrana celular, notadamente os canais de Na^+ e Ca^{2+} para início e conclusão do disparo, e K^+ para manutenção e repolarização do potencial de membrana.

A pressão ventricular é gerada pela força de contração do músculo cardíaco. Esta é captada através de balões inseridos no interior do ventrículo ou ainda pela onda gerada na saída da artéria aorta no momento da contração ventricular. Com isso é possível avaliar o comportamento contrátil do coração diante de diversas patologias, assim como, o seu comportamento diante de substâncias farmacológicas.

A medida do fluxo coronariano é ferramenta indispensável no teste de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, assim como em lesões pós-períodos de isquemias. Este é mensurado pela quantidade de solução de perfusão que passa pelo coração num determinado lapso de tempo. Duas maneiras de mensuração deste parâmetro são bastante utilizadas sendo elas: a determinação do fluxo através de bombas de infusão e/ou mensura-se este parâmetro cronometrando o gotejamento da solução num “cata-bolha” instalado na coluna de perfusão, ou ainda, cronometrando a quantidade de solução que é expelida do átrio direito, mantendo-se a pressão hidrostática de perfusão constante durante o experimento. Os métodos de mensuração já são usados por pesquisadores durante décadas, sendo que estes já passaram por inúmeras modificações (ZIMMER, 2000).

Embora independentes na manifestação funcional, cada uma das propriedades dos diferentes componentes do aparelho cardiovascular está sob a influência reguladora e diferenciada de uma parte do sistema nervoso: o sistema nervoso autônomo, que divide-se em simpático e parassimpático. Diversas substâncias que circulam pelo sangue, também influenciam as propriedades funcionais cardiovasculares. O objetivo das influências nervosas e humorais é a promoção a curto, médio ou longo prazo de ajustes do funcionamento do coração e dos vasos. Dada a sua importância para a funcionalidade cardíaca, a seguir abordaremos o papel da modulação autonômica sobre o coração.

3.2 ANATOMIA DA INERVAÇÃO AUTONÔMICA NO CORAÇÃO

O sistema nervoso autonômico é dividido em dois subsistemas: o Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) (KAWASHIMA, 2005; KUKANOVA & MRAVEC, 2006). A inervação autonômica é controlada por centros regulatórios na parte medial do cérebro, hipotálamo, ponte e medula. Esses centros regulatórios integram os sinais que vêm de outras áreas do cérebro assim como os estímulos aferentes que se

originam dos baroreceptores e dos quimiorreceptores distribuídos na pele, músculos e vísceras. Subseqüentemente, os sinais eferentes (figura 3) seguem os tractos descendentes da parte lateral da medula espinhal que termina nos corpos das células nas porções intermediolateral e intermediomedial da medula (MCDUGALL & MCLEOD, 1996).

As fibras simpáticas deixam a medula espinhal do primeiro segmento torácico (T_1) ao segundo segmento lombar (L_2). As fibras adrenérgicas que inervam o coração originam-se nos gânglios simpáticos (T_1 a T_5 ; vide figura 3). O trajeto percorrido pelas fibras adrenérgicas pelo endocárdio, segue as artérias coronárias da base ao apex do coração (DAE, *et al.* 1989).

A ativação da porção simpática do sistema nervoso autonômico ou a elevação no nível das catecolaminas na fenda sináptica podem resultar na estimulação adrenérgica cardíaca e em mudanças subseqüentes na potência contrátil e eletrofisiológicas do coração (POKROVSKII, 2006). O sistema nervoso simpático é um sistema vasoativo neurohormonal, tendo com seu principal neurotransmissor a noradrenalina (NA), que é exigida para preservar a homeostase circulatória durante o stress ambiental (ARORA, *et al.*, 2001).

A fonte da síntese da noradrenalina é o amino-ácido tirosina, que é convertido para diidroxifenilalanina e então a dopamina. A dopamina é transportada nas vesículas de armazenamento por transporte ativo e transformada em noradrenalina pela enzima β -hidroxilase. A ação da noradrenalina na fenda sináptica é limitada principalmente por reabsorções nas terminações dos nervos pré-sinápticos, porém a noradrenalina livre no citosol é degradada rapidamente em diidroxifenilglicol pela monoamina oxidase e passa da membrana das células pré-sinápticas para o espaço extracelular por difusão passiva. A atividade simpática aumentada conduz, resumidamente, ao aumento da força de contração e da freqüência cardíaca (CARRIÓ, 2001).

Por outro lado, a inervação parassimpática origina-se no tronco cerebral e segue através dos nervos vagos direito e esquerdo, que vão dar origem aos nervos cardíacos superior e inferior (figura 3). As fibras parassimpáticas inervam os átrios modulando a função dos nódulos sinoatrial e atrioventricular. A inervação parassimpática do coração é escassa se comparada com a simpática. Porém, apresenta uma densidade de fibras mais elevada na região dos átrios, e menos elevada na dos ventrículos, com grande significância em ambos locais (CARRIÓ, 2001).

O principal neurotransmissor produzido pelas fibras nervosas parassimpáticas é a acetilcolina (ACh). A ACh é sintetizada a partir da reação da colina (transportada ativamente pelo transportador vesicular de colina) e a acetil-coenzima A (produzida pela mitocôndria) na

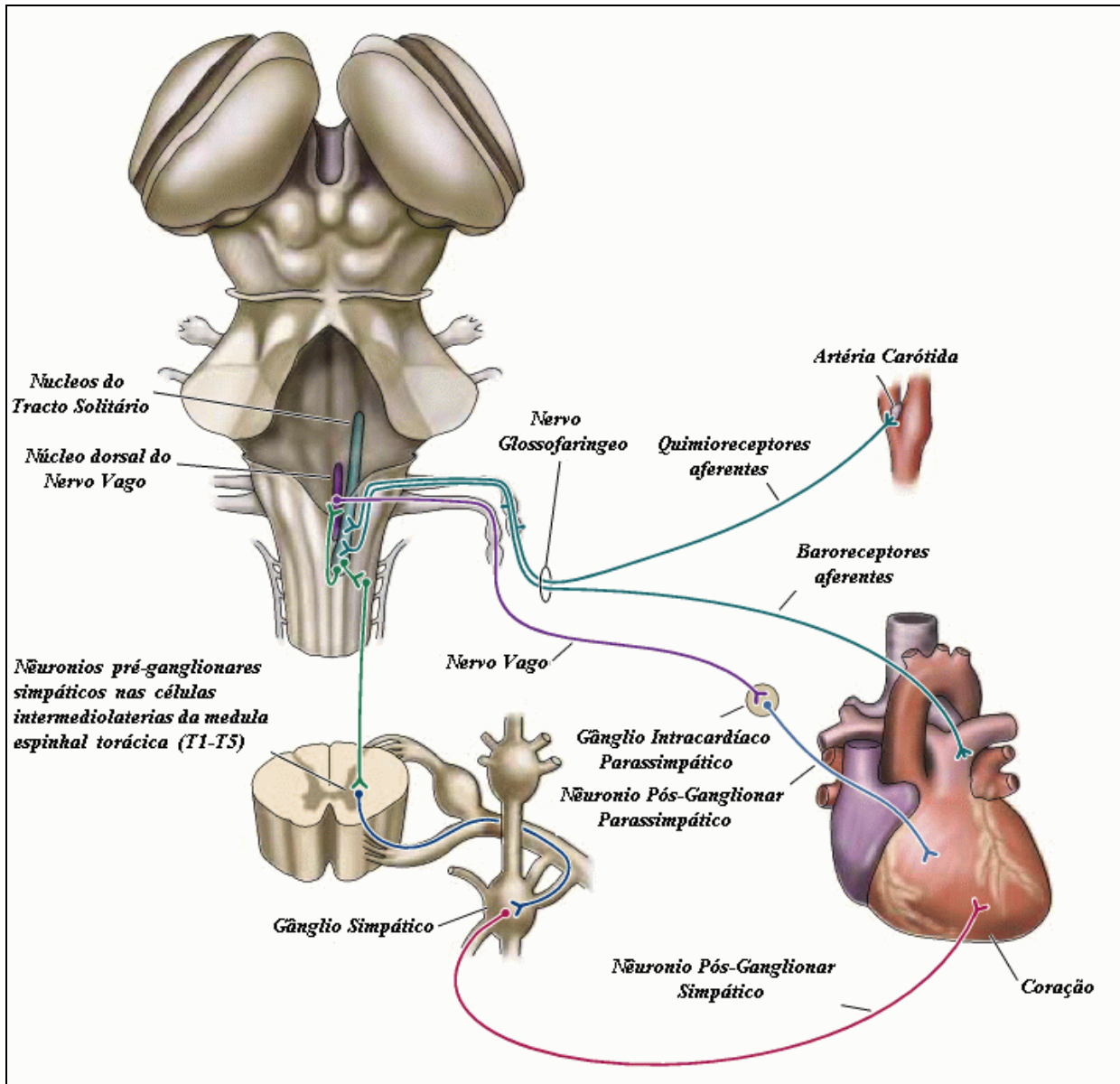


Figura 3: Ilustração da inervação cardíaca pelo sistema nervoso autônomo, observamos o trajeto das ramificação simpática, parassimpática e do nervo glossofaríngeo responsável pelas respostas reflexas cardíacas (Modificado de PURVES *et al.*, 2001).

presença da enzima colina acetil-transferase no citosol das terminações nervosas. O neurotransmissor então armazenado em vesículas, é liberado na fenda sináptica durante a transmissão nervosa. O mesmo tem afinidade pelos receptores muscarínicos (M_2) no tecido cardíaco (LÖFFELHOLZ & PAPPANO, 1985). A ação da ACh é limitada pela ação da acetilcolinesterase (AChE). AChE transforma acetilcolina em colina e ácido acético. A colina é transportada ativamente para o interior do terminal nervoso colinérgico para a produção de novas moléculas de ACh. A atividade parassimpática aumentada resulta, resumidamente, na inibição da frequência e da força de contração cardíaca. Ou seja, em um efeito oposto ao da NA.

3.2.1 Controle Cardíaco Simpático

A nível cardíaco, a ativação simpática resulta no aumento da frequência cardíaca (efeito cronotrópico), no aumento da contratilidade cardíaca (efeito inotrópico), e realça a condução atrioventricular (efeito dromotrópico), por exercer significativa influência na produção de AMPc. Conseqüentemente, o mecanismo pelo qual ativam receptores muscarínicos que regulam respostas dependentes de AMPc e o significado dos efeitos resultantes podem ser apreciados inteiramente com a compreensão de como a estimulação simpática afeta o coração.

A inervação simpática é encontrada em todo o coração (LEVY, 1971), e a estimulação simpática pode produzir efeitos através da ativação dos receptores α e β -adrenérgicos no miócito cardíaco (HARTZELL, 1988). Entretanto, é a sinalização do receptor β -adrenérgico que influencia a atividade de canais iônicos cardíacos a produzirem AMPc. Múltiplos subtipos de receptores β -adrenérgicos são expressados no tecido cardíaco. Isso inclui os receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos, que podem ativar respostas através do AMPc. Entretanto, o endógeno neurotransmissor noradrenalina ativa seletivamente o receptor β_1 -adrenérgico, que é o subtipo predominante de receptor encontrado em corações de mamíferos (BRODDE & MICHEL, 1999). A liberação do agonista conduz à ativação da proteína G estimulatória (G_s) do receptor β -adrenérgico, facilitando a troca de GTP para o GDP e a dissociação da subunidade α das subunidades $\beta\gamma$ (FLEMING *et al.*, 1992). Com a atividade GTP limitada, a subunidade $G_s\alpha$ vai diretamente interagir com todas as isoformas da adenilato ciclase (AC) expressadas no tecido cardíaco para estimular a produção do AMPc (ISHIKAWA & HOMCY, 1997). Esse nucleotídeo cíclico pode então alterar a função de canais iônicos agindo diretamente na proteína dos canais ou indiretamente pela ativação da proteína kinase A (PKA). Pelo menos um canal iônico cardíaco

parece ser afetado pela interação direta do AMPc com a proteína do canal. Estes são os canais de marcapasso expressado primeiramente nas células dos nódulos sinoatrial e atrioventricular tanto quanto em células especializadas na condução elétrica do coração de mamíferos adultos (ACCILI *et al.*, 2002). O cenário mais comum é dos canais iônicos cardíacos regulados por AMPc subsequente a fosforização dependente de PKA (HARTZELL, 1988). Os canais regulados desta maneira incluem o canal de Ca^{2+} tipo-L (TRAUTWEIN *et al.*, 1987), canais de K^+ retificados atrasados (DUCHATELLE-GOURDON *et al.*, 1989; MARX *et al.*, 2002; KUROKAWA *et al.*, 2003), canais de Cl^- do regulador de condutância transmembrânica (HWANG *et al.*, 1992), e canais de Na^+ voltagem dependentes (ONO *et al.*, 1993).

Acredita-se que o efeito do AMPc nos canais de marcapasso gera um mecanismo preliminar subjacente induzido simpaticamente aumentos na frequência do coração (ACCILI *et al.*, 2002), e o efeito da atividade da PKA nos canais de Ca^{2+} consiste num papel chave no regulamento simpático da contração do músculo cardíaco (TSIEN, 1977). As mudanças em canais Ca^{2+} e também na atividade dos canais de Na^+ podem afetar a propagação de impulsos elétricos através das mudanças na velocidade da atividade elétrica acima do seu curso (CHENG *et al.*, 1991). A atividade de canais de Ca^{2+} é também um determinante importante da duração do PA cardíaco, e na ausência de outras mudanças induzidas simpaticamente, ativa canais da Ca^{2+} tipo L causando assim um prolongamento significativo da contração muscular. Caso contrário isto pode potencializar e conduzir ao desenvolvimento de arritmias provocando a despolarização precoce e/ou causando a dispersão da repolarização e possibilitando circuitos de reentrada que são subsídios para gêneses de arritmias (GOAILLARD *et al.*, 2001).

3.2.2 Controle Cardíaco Parassimpático

O componente parassimpático do sistema nervoso autonômico tem um papel importante na regulação fisiológica da função cardíaca exercendo uma influência significativa sobre a iniciação e propagação de impulsos elétricos, além de poder regular a força contrátil (LÖFFELHOLZ & PAPPANO, 1985). Esses efeitos são mediados em inteiro ou em parte através das mudanças na atividade de canais iônicos, que ocorrem em resposta à ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos que seguem a liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Acredita-se que o receptor M_2 é o subtipo predominante expressado no músculo cardíaco (DHEIN *et al.*, 2001). Embora hajam evidências de que outros subtipos de receptores

muscarínicos possam produzir efeitos em algumas preparações cardíacas (GALLO *et al.*, 1993; SHI *et al.*, 1999), o papel destes em mediar respostas fisiológicas não estão totalmente definidos.

O acoplamento do receptor M_2 ativa mudanças na função de canais iônicos cardíacos. Isso pode ser explicado por um dos dois paradigmas gerais. O primeiro envolve a direta regulação de canais iônicos dependentes da proteína G. O segundo envolve a regulação indireta da atividade de canais iônicos com a modulação de respostas dependente do AMPc. A maneira direta do trajeto da sinalização é visto na regulação do acoplamento da proteína G que retifica internamente os canais de K^+ expressado primeiramente no átrio, nódulo sinoatrial, e nas células do nódulo atrioventricular. Este mecanismo mencionado envolve diretamente os receptores muscarínicos M_2 acoplados aos canais de K^+ retificados internamente pela proteína G através da toxina de pertussis (PTX) sensitiva a proteína G_i . A ativação deste caminho resulta na inibição ou no retardamento parassimpático da frequência do coração, e pode também contribuir no retardo da condução do impulso com o nódulo atrioventricular (DASCAL, 1997; MARK & HERLITZE, 2000).

3.2.2.1 Regulação parassimpática inibitória

O efeito indireto e mais freqüente associado à estimulação do receptor muscarínico é uma inibição de respostas dependente de AMPc. A habilidade da ativação do receptor M_2 de inibir respostas dependentes de AMPc foi denominada de antagonista acentuado (LEVY, 1971). Mais especificamente, isso deve-se ao fato de que a resposta inibitória da ativação do receptor muscarínico é mais proeminente ou torna-se evidente na presença da estimulação simpática ou do receptor β -adrenérgico, sendo especialmente verdadeiro em relação aos efeitos da estimulação parassimpática na função ventricular. De fato, há uma concepção comum de que os receptores muscarínicos não estão expressos no tecido ventricular, desde que os agonistas muscarínicos quase não têm efeito na função ventricular sob circunstâncias basal (LEVY, 1995). Entretanto, há uma inervação parassimpática significativa no miocárdio ventricular (STANDISH *et al.*, 1994), e os receptores muscarínicos são expressos por todas as áreas do coração, incluindo os ventrículos (LÖFFELHOLZ & PAPPANO, 1985). Na maioria dos mamíferos, as respostas muscarínicas são observadas somente nos miócitos ventriculares de adultos sob as condições de aumento da produção de AMPc acima dos níveis basais, através de um mecanismo similar a ativação do receptor β -adrenérgico (MCDONALD *et al.*, 1994). Em contraste, a nível atrial e das células do

nódulo sinoatrial, a ativação do receptor M_2 pode produzir mudanças na função dos canais iônicos associados tipicamente com o antagonismo de respostas dependentes de AMPc mesmo na ausência de um agonista que estimule a produção do AMPc (VANDECASTEELE *et al.*, 1998). Isto está em concordância com a idéia de que, mesmo que as células atriais estejam em condição basal, à atividade da AC é realçada, tendo como resultado a produção aumentada de AMPc, que pode então ser inibida pela ativação do receptor muscarínico (MÉRY *et al.*, 1997).

Identificar o mecanismo pelo qual a ativação do receptor M_2 pode antagonizar as respostas dependente de AMPc foi uma área ativa de investigações por mais de quatro décadas. Os estudos mais avançados demonstraram que a exposição a ACh pode reduzir níveis do AMPc no tecido cardíaco (MURAD *et al.*, 1962; LÖFFELHOLZ & PAPPANO, 1985). Tal efeito foi atribuído à inibição da atividade da AC por um mecanismo que envolve a PTX sensível a proteína G (HAZEKI & UI, 1981). Os estudos bioquímicos subseqüentes demonstraram que duas isoformas da AC estão expressadas no músculo cardíaco (AC5 e AC6) e podem ser inibidas pela interação direta quando ativada a subunidade α da PTX sensível a proteína G_i e G_o , (SMIT & IYENGAR, 1998), dando suporte experimental à idéia de que a ACh pode antagonizar a respostas β -adrenérgica inibindo a síntese do AMPc.

Outros estudos sugerem que os efeitos inibitórios da ACh nem sempre são correlacionados com as mudanças em níveis de AMPc (BIEGON & PAPPANO, 1980). Isto conduziu a especulações de que a ACh pôde antagonizar respostas dependentes de AMPc estimulando a atividade da fosfatase e realçar a desfosforilação da proteína (STEMMER *et al.*, 2000; SHEN & PAPPANO, 2002). Embora tal mecanismo pudesse em tese contribuir ao menos parcialmente à habilidade da ACh de antagonizar as respostas dependentes de AMPc, não foi possível demonstrar que ACh estimula diretamente a taxa de desfosforilação da proteína em miócitos cardíacos (STEMMER *et al.*, 2000). Além disso, não se pode explicar a habilidade da ativação do receptor M_2 de antagonizar as respostas que não dependem da fosforilação dependente da PKA, tal como a regulação dependente de AMPc direta do canal de marcapasso (DIFRANCESCO & TORTORA, 1991).

O dissociação das respostas da ACh e das mudanças em níveis do AMPc podem refletir o fato de que a ativação do receptor muscarínico parece afetar a produção do AMPc nos domínios sub celulares, que não podem ser localizados no tecido ou mesmo a nível celular. A sustentação para esta conclusão vem do trabalho que demonstra que ACh afeta os canais de Ca^{2+} ventricular

somente quando o agonista muscarínico é aplicado à mesma posição sub celular que o agonista β -adrenérgico que está sendo usado, e este inicia uma resposta dependente de AMPc (JUREVICIUS & FISCHMEISTER, 1996). A localização das respostas muscarínicas para discretos domínios sub-celulares pode ajudar a explicar como a ativação do receptor M_2 regula diferentes respostas dependentes de AMPc e a estimulação dos receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos (APRIGLIANO *et al.*, 1997). Com o desenvolvimento das técnicas que permitem a imagem latente sub celular da atividade do AMPc (GOAILLARD *et al.*, 2001; ZACCOLO & POZZAN, 2002), logo haverá possibilidade de identificar o teste padrão subcelular preciso das mudanças nos níveis do AMPc que ocorre da ativação seguida de diferentes proteínas G acopladas aos receptores (HARVEY & BELEVYCH, 2003).

3.2.2.2 *Regulação parassimpática estimulatória*

A facilitação da resposta dependente de AMPc através do receptor muscarínico, não está extensamente reconhecida. Apesar da ativação do receptor muscarínico poder potencializar o antagonista da respostas β -adrenérgica, esse estímulo parassimpático ao coração produz significativos efeitos estimulatórios. Uma manifestação clara deste efeito é o aumento da frequência e da contratilidade do coração que pode ser observado imediatamente depois da terminação da estimulação vagal ou da cessação da exposição a ACh (LEVY, 1971; BURKE & CALARESU, 1972). Uma sugestão foi que estes efeitos estimulatórios da ACh pode ser devido à liberação das catecolaminas das fibras pré-sinápticas simpáticas ou dos armazenamentos extraneuronais (LOEB & VASSALLE, 1979). Entretanto, as respostas a ACh podem ser observadas em miócitos cardíacos isolados (BELEVYCH & HARVEY, 2000; BELEVYCH *et al.*, 2001).

A possibilidade de que a ACh esteja envolvida na modulação da transmissão simpática foi postulada inicialmente por Burn & Rand em 1959. Em 1968, Burn propôs que terminais nervosos colinérgicos estariam em íntimo contato com terminais nervosos simpáticos. Mais tarde, estudos histológicos mostraram a existência de interações axo-axonais simpato-colinérgicas em vários tecidos, incluindo o coração (KOSTERLITZ *et al.*, 1967; CAMPBELL *et al.*, 1989; CAMPBELL & HODOS, 1970; FURNESS & IWAYAMA, 1972; LINDMAR *et al.*, 1979). A presença de colinoceptores em neurônios simpáticos e adrenoceptores em neurônios colinérgicos em tecidos com interações axo-axonais simpato-colinérgicas permite maior integração entre o SNS e o SNP

(BURNSTOCK & COSTA, 1975). Neste caso, as descargas repetitivas dos neurônios colinérgicos produziriam concentrações de ACh nas sinapses simpáticas capazes de estimular os colinoceptores nicotínicos facilitatórios da liberação de NA (BURNSTOCK & COSTA, 1975). No coração, demonstrou-se que a ACh liberada dos neurônios colinérgicos pode estimular a liberação de NA mediante a ativação de colinoceptores nicotínicos presentes nos axônios simpáticos (FUDER & MUSCHOLL, 1995). Causando assim um efeito estimulatório após a terminação da estimulação vagal ou da cessação da exposição a ACh.

4 METODOLOGIA

4.1 ABORDAGEM GERAL

Neste trabalho buscamos avaliar a influência da modulação autonômica sobre a resposta funcional do coração isolado de rato na preparação de Langendorff em circuito fechado e de baixo volume circulante (100 ml). Para isto, conforme colocado nos objetivos específicos, testamos as seguintes hipóteses: 1^a) a(s) substância(s) que compromete(m) a funcionalidade cardíaca é (são) liberada(s) pelo próprio coração na solução circulante e 2^a) a funcionalidade do coração é mediada pelo sistema nervoso autonômico.

Duas abordagens experimentais foram adotadas para testar estas hipóteses:

1^a- Avaliamos a funcionalidade de corações perfundidos em circuito fechado (anteriormente perfundido em circuito aberto) com a solução proveniente de outro coração que estava em circuito fechado e com sua funcionalidade já comprometida;

2^a- Avaliamos o efeito de agonistas e antagonistas do sistema nervoso autonômico.

Em ambas abordagens foram quantificados três parâmetros fisiológicos do coração: *frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo da perfusão cardíaca.*

A contagem do tempo de experimento iniciou-se a partir da canulação do coração, ocorrida entre 3 e 4 minutos da eutanásia do animal. Os 3 parâmetros anteriormente citados foram avaliados a cada 10 min. Nos testes com agonistas ou antagonistas autonômicos, o coração foi mantido em circuito aberto por 10 min na ausência de qualquer tipo de fármaco, para então, em seguida, ser submetido a circuito fechado com a solução contendo o fármaco a ser usado.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca (LEC) do Núcleo de Pesquisa Tecnológica (NPT) da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Abaixo apresenta-se uma descrição detalhada destas abordagens experimentais.

4.2 ANIMAIS

Foi utilizado uma preparação de coração isolado de ratos Wistar machos adultos (3 meses) com peso médio de 290 ± 5 g (média e erro padrão, N = 50), provenientes do Biotério Central da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (50 cm x 40 cm) padronizada, com cama de maravalha esterilizada e sob condições ambientais estáveis (temperatura ambiental de 22 ± 2 °C, umidade relativa do ar 45% a 75% e duração do fotoperíodo no regime de 12 horas claro / 12 horas escuro invertido). Os animais utilizados foram pesados em balança (Ramuz, Ind. Com. Balanças Ltda) antes do início dos experimentos. Para manter as condições de estabilidade necessária para a espécie, os seguintes cuidados foram tomados: o número de animais por gaiolas não foi superior a cinco e a troca e limpeza das gaiolas foram realizadas sempre pela mesma pessoa numa frequência de três vezes por semana em dias alternados. Água acidificada com HCl IN (pH entre 2 -3) e ração comercial peletizada (Nuvilab[®] CR-1) foram fornecidas em regime *ad libitum*.

4.3 SOLUÇÃO FISIOLÓGICA

Utilizamos solução de Krebs-Henseleit (K-H) composta pelos seguintes reagentes (mM): NaCl 126,4; KCl 4,6; KH₂PO 1,2; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 1,5; glicose 11,1, tendo o seu pH estabilizado em 7,4 com bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 13,6) a 34,5°C. A solução é continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂) para oxigenação da amostra e estabilização do pH.

Para pesar os reagentes que compunham a solução de K-H foi utilizado uma balança digital (Ohaus[®] Corporation E02140), e um pHmetro (Digimed[®] DM-22) para aferir o pH da mesma. Após sua homogeneização a solução de K-H é armazenada em uma geladeira (Continental[®] Eleganci) na temperatura de aproximadamente 8°C e reaquecida no dia e minutos antes do experimento em banho maria (Fanem[®] 102) a temperatura de 34,5°C.

4.4 PREPARAÇÃO BIOLÓGICA

Os animais foram submetidos à eutanásia por concussão cerebral, sendo então decapitados e seus corações retirados após rápida abertura da caixa torácica e dissecação. Este procedimento

está de acordo com o “Canadian Council on Animal Care” (1993) e aprovado pela Comissão de Ética em Manipulação e Experimentação Animal da Universidade de Mogi das Cruzes (CEMEA).

Após a remoção do coração, o mesmo foi colocado em uma placa de Petri e submetido à limpeza, retirando estruturas circunvizinhas que permanecem junto a amostra, sendo em seguida posicionado através de ligadura a uma cânula (inserida na artéria aorta) fixada na montagem experimental (preparação de Langendorff), para assim ser perfundido retrogradamente com solução de K-H a 34,5°C. A descrição detalhada da preparação de Langendorff é feita a seguir.

4.5 MONTAGEM EXPERIMENTAL

Duas configurações básicas da montagem de Langendorff foram adotadas: 1) Perfusão em circuito aberto (ou não re-circulante) e 2) Perfusão em circuito fechado (ou re-circulante).

No circuito aberto (figura 4), a solução de perfusão que encontra-se no reservatório de solução, borbulhada constantemente com 5%CO₂ e 95%O₂, cai por gravidade do reservatório através de uma tubulação de silicone (linha de perfusão); entra na artéria aorta através de uma cânula e, deste modo, perfunde o coração através das artérias coronárias. A solução é descartada após perfundir o coração. Uma pressão hidrostática constante de 82 cm de água é mantida no coração nesta configuração.

A principal diferença da montagem em circuito aberto para a de circuito fechado é que, no circuito fechado, a solução que perfundiu o coração é retornada ao reservatório para nova perfusão do coração. Em trabalho de mestrado desenvolvido no LEC (NECCHI-JR, 2006), foi concebido um aparato de re-circulação a vácuo da solução para o reservatório (figura 5). Nesta montagem, a solução passa do reservatório (B) por uma coluna com 82cm de altura (2) e perfunde o coração em uma câmara com solução aquecida (C). Para re-circular a solução, uma bomba (5) gera vácuo, sugando a solução da câmara (C) jogando-a para uma câmara de vácuo (A), acima do reservatório (B). Em seguida, o vácuo é interrompido e é permitida a entrada de ar na câmara de vácuo (A), fazendo com que a solução passe, via válvula passiva (1), para o reservatório (B) e possa novamente perfundir o coração. Para que o sistema ora gere vácuo, ora permita a entrada de ar na câmara (A), é utilizada uma torneira de 3 vias acoplada ao eixo de um motor giratório (3).

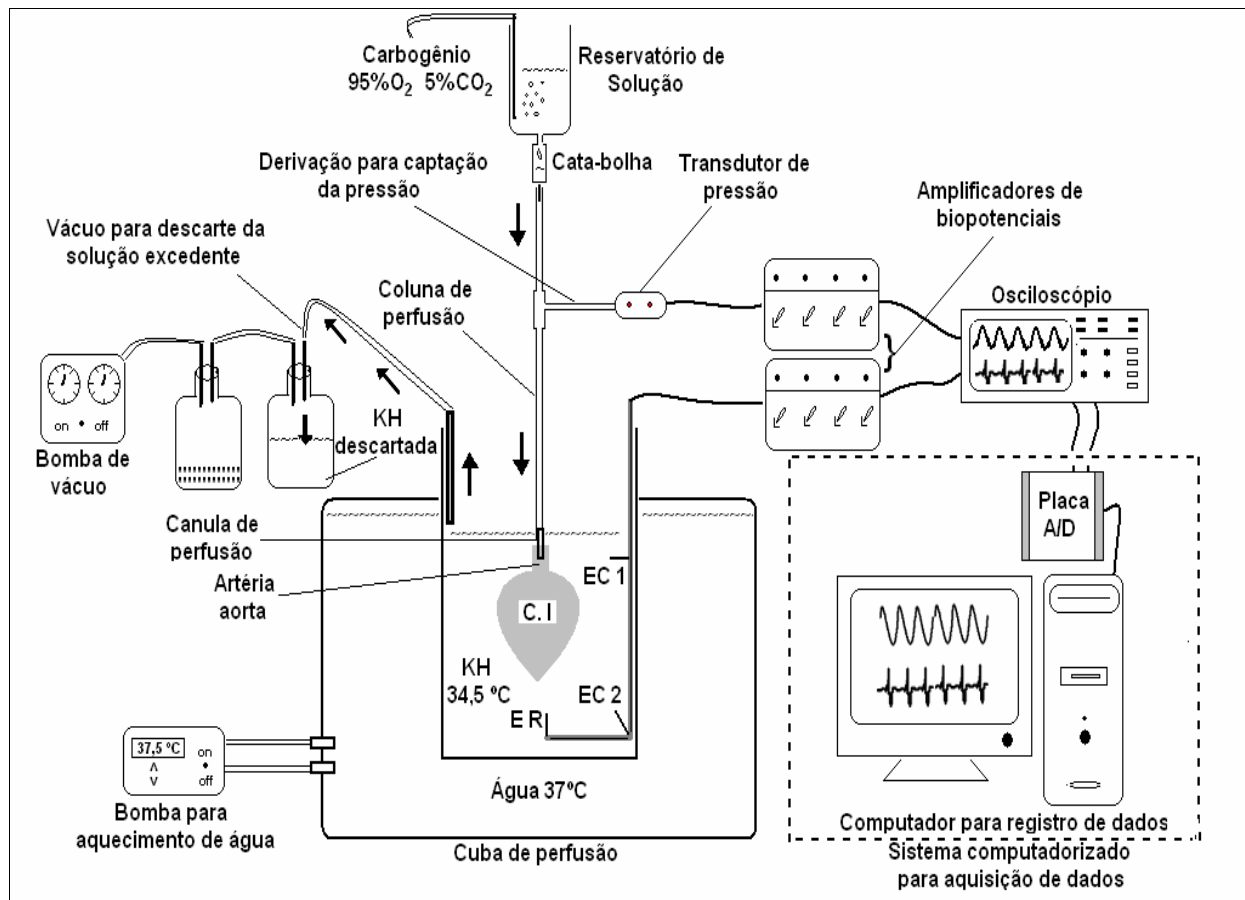


Figura 4: Ilustração da montagem de Langendorff completa em circuito aberto. O percurso da solução de perfusão (KH) do coração isolado (CI) está indicado pelas setas (do reservatório de solução até o recipiente de vácuo para descarte da solução excedente). O aparato para captação, visualização e aquisição dos parâmetros cardíacos também é ilustrado. O traçado do ECG é captado pelos eletrodos de captação (EC 1 e EC 2) e de referência (ER) e amplificado por amplificador de biopotenciais. A Pressão Ventricular Esquerda é captada através do transdutor de pressão e amplificada por amplificador de biopotenciais. Estes parâmetros são visualizados em um osciloscópio e registrados através de um sistema computadorizado para aquisição de dados. O fluxo da perfusão é captado através da contagem do gotejamento no “cata-bolha”, durante 1 minuto.

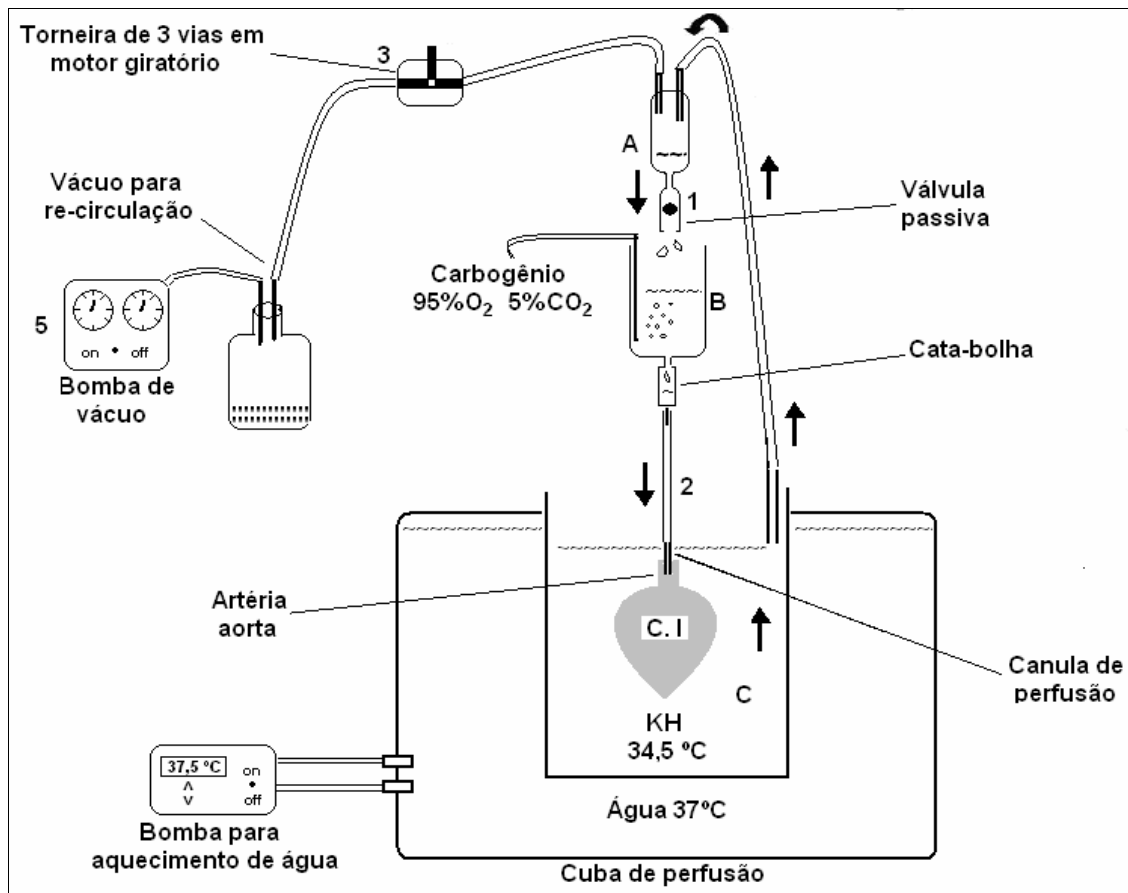


Figura 5: Ilustração da montagem experimental de Langendorff em circuito fechado. O trajeto da solução (KH) de perfusão do coração isolado (CI) está indicado com as setas (a solução sai do reservatório (B) e retorna a ele, para re-perfundir o coração). O sistema de captação, amplificação e aquisição dos parâmetros cardíacos está omitido nesta ilustração.

4.6 FÁRMACOS

Utilizamos fármacos que promovem a estimulação ou a inibição da modulação autonômica cardíaca. Os fármacos foram adicionados à solução de perfusão numa concentração final de 1 μM , exceto o isoproterenol que foi utilizado na concentração de 0,01 μM , diluídos de soluções estoques mais concentradas no momento do experimento.

Os fármacos e suas finalidades nos testes experimentais são descritos a seguir:

A. Atropina (bloqueador colinérgico muscarínico): utilizado como agonista seletivo dos receptores muscarínicos colinérgicos.

B. Fisostigmina (estimulante indireto do sistema colinérgico muscarínico): utilizado como anti-colinesterásico que promove aumento na concentração de acetilcolina (ACh).

C. Carbacol (estimulante colinérgico muscarínico): utilizado como agonista seletivo dos receptores muscarínicos colinérgicos.

D. Dimetilfenilpiperazínio - DMPP (estimulador do sistema autonômico): utilizado como agonista dos receptores nicotínicos pré-sinápticos.

E. Propranolol (bloqueador do sistema adrenérgico): utilizado como antagonista seletivo dos receptores β – adrenérgicos.

F. Isoproterenol (estimulante adrenérgico): utilizado como agonista seletivo dos receptores β – adrenérgicos.

Os fármacos utilizados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Afonso Caricate Neto do Laboratório de Farmacologia Molecular, Autonômica e Cardiovascular do Setor de Ação de Drogas no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Para determinar se a substância que compromete a funcionalidade cardíaca é liberada pelo próprio coração e permanece na solução circulante.

“Grupo Troca de Solução”

Neste grupo, a solução circulante em circuito fechado do coração C₁ (N=5), foi transferida, após 50 min nestas condições, para perfusão fechada de outro coração C₂ (N=5) anteriormente em circuito aberto C₂. Visava-se analisar o efeito da solução perfusante do coração C₁, após a depressão da sua funcionalidade, sobre o coração C₂ que mantinha-se funcional em circuito aberto.

4.7.2 Para avaliar a funcionalidade cardíaca ora sobre o efeito do bloqueio e ora sobre o efeito da estimulação do sistema colinérgico muscarínico.

“Grupo Atropina”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito do bloqueio colinérgico muscarínico sobre a queda da funcionalidade do coração isolado de rato em circuito fechado (100 ml). O grupo foi composto por corações isolados (N = 7) em circuito fechado com baixo volume circulante com 1 µM de Atropina na solução de KH.

“Grupo Fisostigmina”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito da estimulação indireta do sistema colinérgico muscarínico sobre a queda da funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 5) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 1 µM de Fisostigmina na solução de KH.

“Grupo Carbacol”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito da estimulação direta do sistema colinérgico muscarínico sobre a queda da funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 5) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 1 µM de Carbacol na solução de KH.

4.7.3 Para avaliar a funcionalidade cardíaca ora sobre o efeito do bloqueio e ora sobre o efeito da estimulação do sistema β-adrenérgico.

“Grupo Propranolol”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito do bloqueio do sistema adrenérgico sobre a funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 5) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 1 μ M de Propranolol na solução de KH.

“Grupo Isoproteronol”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito da estimulação direta do sistema adrenérgico sobre a funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 3) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 0,01 μ M de Isoproteronol na solução de KH.

“Grupo Isoproteronol e Atropina”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito da estimulação do sistema adrenérgico e do bloqueio colinérgico muscarínico sobre a funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 3) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 0,01 μ M de Isoproteronol e 1 μ M de Atropina na solução de KH.

4.7.4 Para avaliar a integralidade pré sináptica do sistema nervoso autonômico.

“Grupo DMPP”

Grupo experimental montado para avaliação da integridade da modulação autonômica cardíaca de rato com o coração isolado com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 6) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 1 μ M de DMPP na solução de KH.

“Grupo DMPP e Atropina”

Grupo experimental montado para avaliação do efeito da estimulação do sistema adrenérgico e do bloqueio colinérgico muscarínico sobre a funcionalidade do coração isolado de rato com baixo volume circulante. O grupo foi composto por corações isolados (N = 6) em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml) com 1 μ M de DMPP e 1 μ M Atropina na solução de KH.

4.8 INSTRUMENTAÇÃO

A figura 4 (pg. 37) ilustra a montagem experimental completa utilizada. O eletrocardiograma (ECG) do coração isolado foi captado por 2 eletrodos (Ag/AgCl) de captação e 1 eletrodo (Ag/AgCl) de referência colocados na solução da cuba de perfusão. Estes eletrodos foram conectados a um Amplificador de Biopotenciais desenvolvido no Laboratório de Instrumentação Biomédica (LIB), para amplificar os potenciais elétricos gerados pelo coração. Este amplificador continha filtro de 1ª ordem passa-baixa (3Hz), filtro de 3ª ordem passa-alta (100Hz) e filtro Notch (60Hz) do tipo Butterworth, todos acoplados em série.

A pressão gerada no ventrículo esquerdo foi captada por meio de um transdutor de pressão (Narco® Bio-systems, modelo P100B, cedido pelo Prof. Dr. JWM Bassani, DEB/FEEC/UNICAMP), acoplado a uma derivação do equipo de perfusão por uma torneira de três vias posicionada no mesmo nível do coração. O sinal da pressão ventricular esquerda foi amplificado em 10x por um amplificador diferencial dotado de filtro passa-baixa ativo tipo Butterworth de 2ª ordem, com frequência de corte em 22,5Hz.

O fluxo de perfusão do coração foi obtido pela contagem, durante um minuto, do gotejamento da solução de perfusão em um “cata-bolhas” instalado no reservatório de solução.

O ECG e a onda resultante da pressão ventricular esquerda foram visualizados em um Osciloscópio (Tektronix® TDS210) para monitoramento dos sinais elétricos e mecânicos do coração. Estes sinais foram armazenadas em disco rígido através de um sistema computadorizado para aquisição de dados. Este sistema é constituído de um Notebook (Acer® móbile AMD® Sempron™ processador 3100 com sistema operacional Windows® XP), acoplado, via adaptador de rede Ethernet, a uma placa conversora analógica digital – placa A/D – (Lynx AC1160). O sinal captado foi acondicionado via programa de aquisição de sinal (AqDados® 7.02), sendo os

registros analisados no programa AqDAnalysis[®] 7 (Lynx Tecn. Electr. Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

4.8.1 Calibrações

As calibrações foram realizadas para se verificar o perfeito funcionamento dos equipamentos utilizados para captação dos parâmetros cardíacos durante a experimentação, assim como estabelecer os valores para conversão dos parâmetros cardíacos avaliados.

O transdutor de pressão foi calibrado, todas as vezes, minutos antes do início de qualquer experimento, através dos botões de autocalibração do aparelho. A figura 6 apresenta a curva de calibração do transdutor de pressão. A curva foi obtida através de pressões conhecidas fornecidas por um esfignanômetro, possibilitando assim determinarmos o fator de calibração utilizado para conversão de Tensão (V) para milímetros de mercúrio (mmHg).

A calibração da montagem que possibilitou a captação do parâmetro “Fluxo da Perfusão” foi feita através da pesagem das gotas em uma balança digital (Ohaus[®] Corporation E02140), estabelecendo que o peso de 13,3 gotas equivalem a 1 ml de solução. Com isso conseguimos calcular o volume de cada gota. Podendo assim transforma gotas por minuto (g/min) em mililitros por minuto (ml/min).

O osciloscópio também foi devidamente calibrado antes dos experimentos, sendo isto feito através do sinal de autocalibração do aparelho.

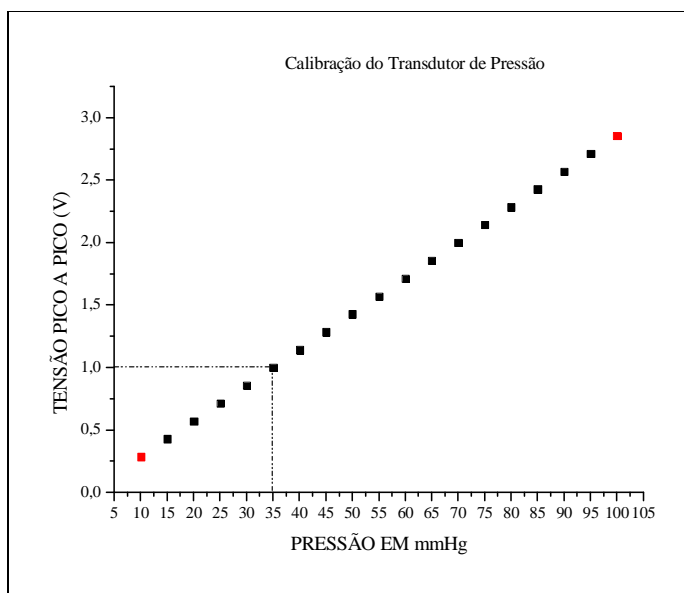


Figura 6: Gráfico de calibração do transdutor de pressão, onde os pontos em vermelho representam os botões de autocalibração do transdutor e os demais as pressões conhecidas fornecidas por um esfigmômetro.

4.9 PARÂMETROS AVALIADOS

A frequência cardíaca, expressa em batimentos por minuto (bpm), foi calculada através da expressão (ver anexo A):

$$FC_{(bpm)} = \frac{1}{T_{(s)}} \times 60 \quad (bpm)$$

Onde, T é o intervalo em segundos (s) entre picos registrados no traçado eletrocardiográfico (ECG; figura 7A) captado do coração isolado de rato, visualizado no osciloscópio e registrado no sistema de arquivo de dados.

A pressão ventricular esquerda, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg), foi calculada através da expressão (ver anexo A):

$$P_{ve} = S_v \times f_c \quad (\text{mmHg})$$

Onde, S_v é a tensão (em volts) pico a pico do sinal proveniente do transdutor de pressão e, f_c é o fator de calibração do transdutor: 35 mmHg/Volt (na figura 7B ilustra-se um sinal de pressão tipicamente obtido nos experimentos).

O fluxo da perfusão, expresso em mililitros por minuto (ml/min), foi obtido através da expressão (ver anexo A):

$$F_p = N_g \times V_g \quad (\text{ml/min})$$

Onde, N_g é o número de gotas, por minuto, contadas no “cata-bolhas” instalado no reservatório de solução; e V_g é o volume de uma gota obtido na calibração da montagem: 0,077 ml.

Resistência ao fluxo de cada coração isolado (R_f) foi calculada em todos os grupos experimentais por meio da expressão (ver anexo B):

$$R_f = \frac{P_{ve}}{F_p} \quad \left(\frac{\text{mmHg} \times \text{min}}{\text{ml}} \right)$$

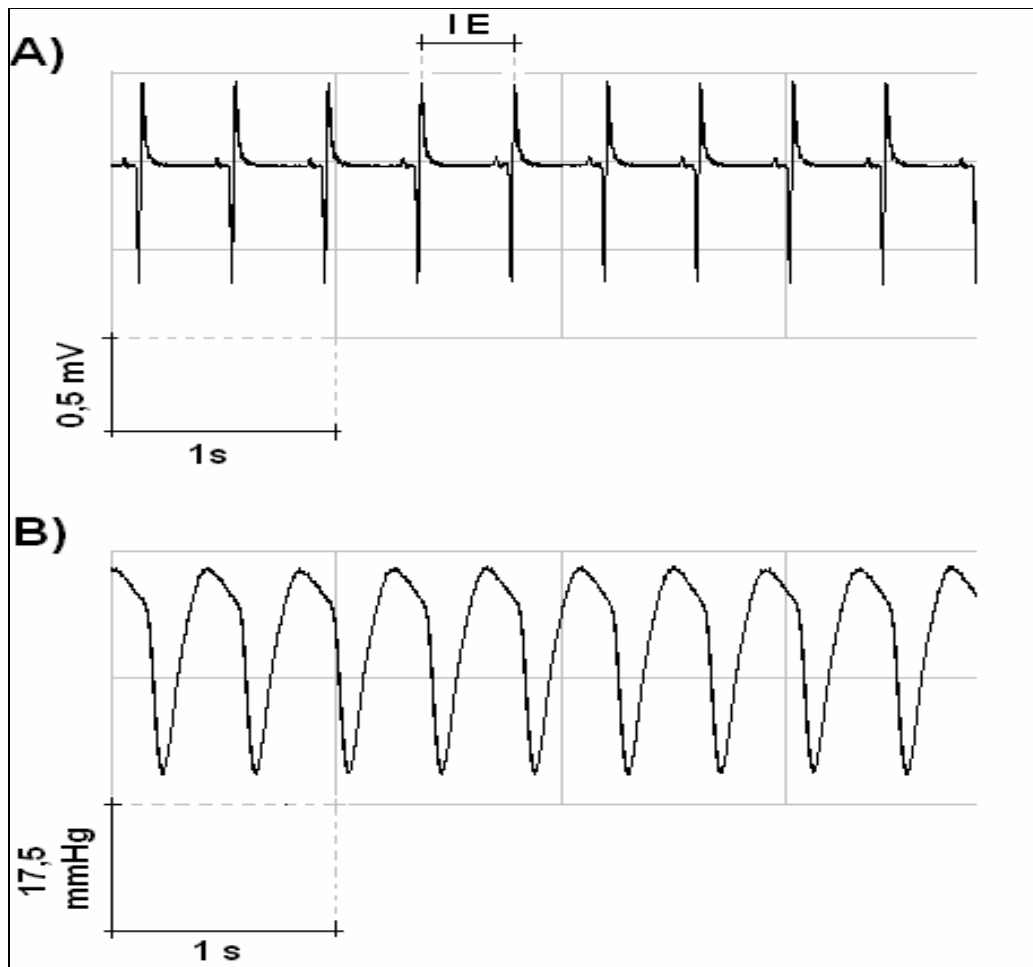


Figura 7: Registros A – ECG (amplificado 10.000x) e, B – da pressão ventricular (amplificado 10x) de coração de rato isolado em montagem de Langendorff. IE representa o intervalo espontâneo entre picos do ECG.

5 RESULTADOS

A. Troca de Solução

A fim de avaliar se as substâncias que provocam as alterações dos parâmetros funcionais cardíacos são liberadas na solução de perfusão, estudamos o efeito da troca de solução do coração C_1 para o coração C_2 . Assim, a solução de perfusão foi mantida durante 50 min. em contato com C_1 e depois transferida para C_2 . Este último foi previamente perfundido em circuito aberto. A figura 8 mostra a variação da frequência cardíaca (FC), pressão ventricular esquerda (PVE) e fluxo da perfusão (FP) nos corações C_1 e C_2 .

Em C_1 verificou-se uma queda progressiva da FC (152 a 50 bpm), da PVE (25,2 a 10,5 mmHg) e do FP (6,3 a 1,3 ml/min) até os 50 min. de experimento, tempo o qual foi efetuada a troca da solução, passando este para perfusão em circuito aberto, acarretando na estabilização dos seus parâmetros com valores abaixo do normal até o final de 2 horas de experimento.

Por outro lado em C_2 , observamos que enquanto este foi perfundido em circuito aberto os parâmetros mantiveram-se estáveis. Porém quando recebeu a solução proveniente de C_1 , os parâmetros FC, PVE e FP sofreram acentuada queda. Sendo que a FC decaiu 50%, a PVE 85,3% e FP 88,2% em 10 min de perfusão com a solução proveniente de C_1 , apresentando valores nulos aos 80 min. de experimento.

B. Bloqueio colinérgico muscarínico

Com a finalidade de avaliar se a queda da funcionalidade dos corações isolados com baixo volume circulante é mediada pelo sistema colinérgico muscarínico, produzimos o bloqueio colinérgico muscarínico com 1 μ M de Atropina (antagonista muscarínico). A figura 9 demonstra a variação da FC (figura 9A), PVE (figura 9B) e FP (figura 9C) sobre o efeito do bloqueio colinérgico muscarínico.

Observamos que o bloqueio colinérgico muscarínico atenuou a queda dos parâmetros cardíacos, pois a FC média apresentada aos 70 min pelo grupo banhado com atropina ainda era de 128 bpm (68,6% da inicial), e já no grupo controle (fechado 100ml) aos 70 min este parâmetro encontra-se com valores nulos. A PVE média deste grupo variou de 15,5 a 7,0 mmHg, porém aos 70 min. foi de 68,5% da inicial. Enquanto que o grupo controle apresentou valores nulos para o tempo de 70 min. de experimento. O FP, semelhante a PVE, também apresentou melhores condições com a realização do bloqueio colinérgico muscarínico variando de 7,4 a 1,5 durante

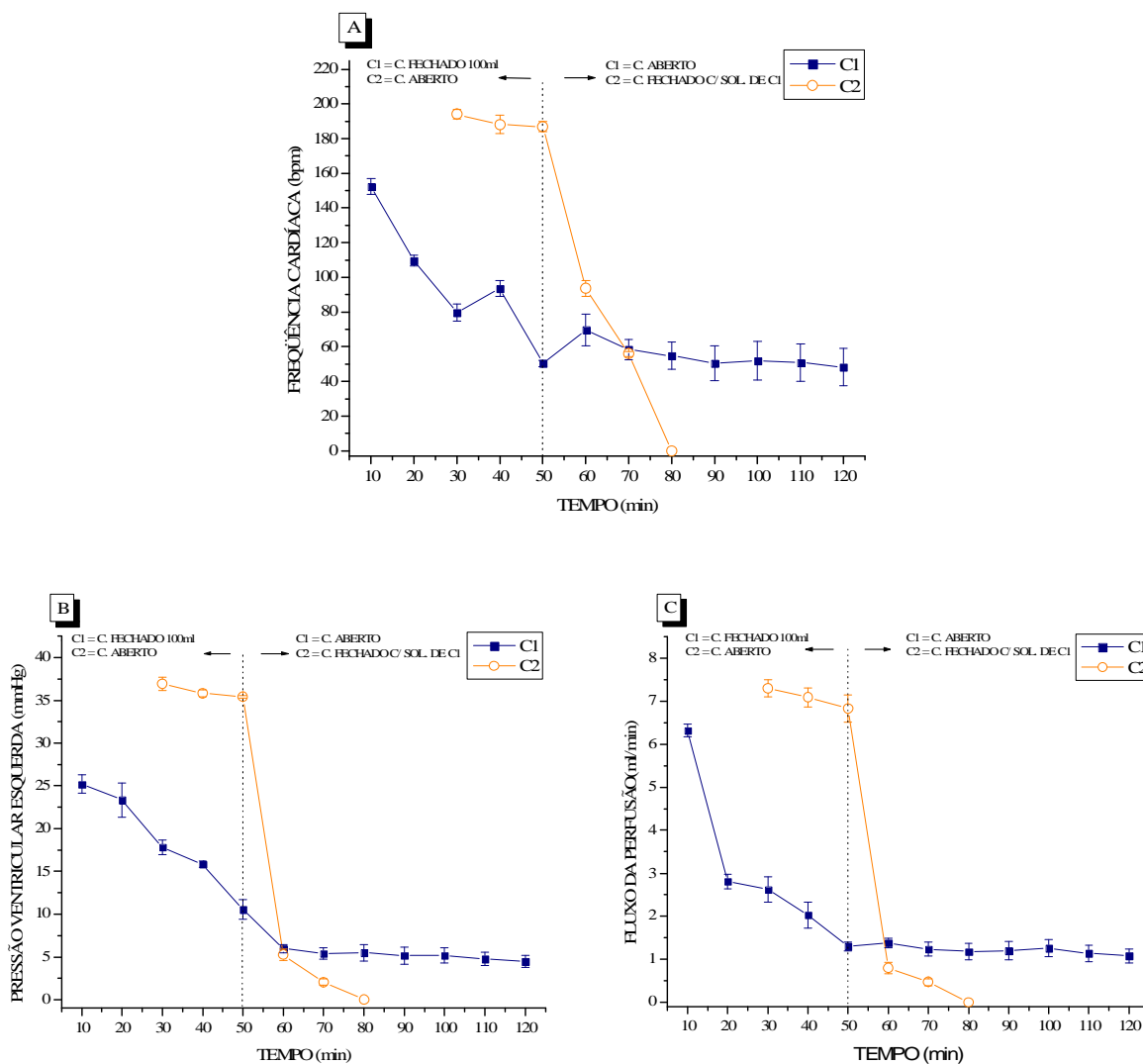


Figura 8: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) no grupo "Troca de Solução" (C_1 N=5 e C_2 N=5), ao longo do tempo de experimento. Observa-se que os resultados de C_2 apresentam-se somente a partir de 30 min. para representação do momento da troca de solução entre os dois corações.

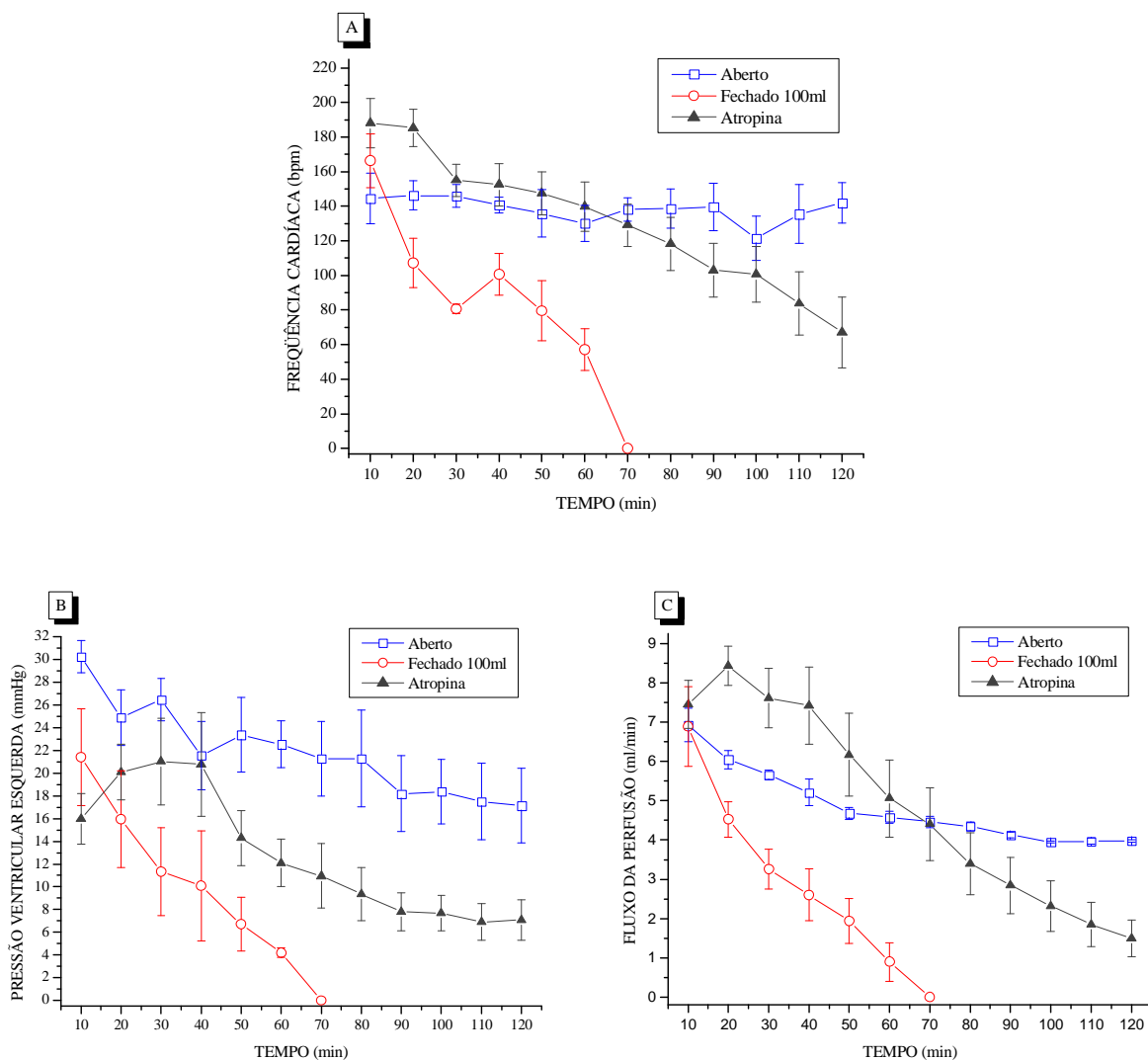


Figura 9: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “Aberto”(N=5), “Fechado 100ml”(N=5) e “Atropina”(N=7), ao longo do tempo de experimento.

120 min de experimento, sendo que aos 70 min. de experimento o grupo controle já apresentava valores nulos do FP e o grupo tratado com atropina ainda mantinha 59,4% do FP inicial.

C. Estimulação colinérgica muscarínica

Para avaliarmos a funcionalidade cardíaca de corações isolados de rato com baixo volume circulante sobre o efeito da estimulação do sistema colinérgico muscarínico, primeiramente banhamos nossa amostra com 1 μ M de fisostigmina (anticolinesterásico). Na figura 10 apresenta-se as variações da FC (figura 10A), PVE (figura 10B) e FP (figura 10C) durante o tempo de experimento neste grupo experimental. Observamos que os parâmetros avaliados decaíram do início aos 60 min. de experimento, apresentando as seguintes variações: FC de 198 a 27 bpm, a PVE de 21,2 a 2,6 mmHg e o FP de 8,4 a 2,2 ml/min. Aos 70 min. de experimento assim como no grupo controle os parâmetros avaliados apresentaram valores nulos.

No grupo controle observamos uma recuperação transitória do 30^o ao 40^o min. do experimento. Contudo, este fenômeno não ocorre durante a estimulação do sistema colinérgico muscarínico efetuada nos grupos apresentados na figura 10.

Por outro lado quando tratamos a preparação com 1 μ M de Carbacol (agonista dos receptores muscarínicos), com a finalidade de também estimularmos o sistema colinérgico muscarínico, observamos (figura 10) que os parâmetros decaíram significativamente do início ao 30^o min. do experimento com as seguintes variações: FC de 203 para 30 bpm, PVE de 35,7 para 17,6 mmHg e o FP de 6,1 para 2,4 ml/min. Assim como no grupo citado anteriormente, a recuperação transitória que o grupo controle apresenta do 30^o ao 40^o min de experimento não ocorre. Sendo que os parâmetros avaliados neste grupo apresentam valores nulos aos 40 min. do experimento, ou seja, 30 min. antes do grupo controle (fechado 100 ml).

D. Análise qualitativa dos testes realizados com fármacos sobre o sistema colinérgico muscarínico.

A figura 11 ilustra todos os parâmetros cardíacos avaliados nos experimentos citados anteriormente. Para efeito de clareza, os dados foram normalizados em relação aos dados obtidos no tempo de 10 min. de experimento.

Qualitativamente, a queda dos parâmetros avaliados na condição experimental com estimulação do sistema colinérgico muscarínico está acentuada em relação à do grupo “*Fechado 100 ml*” (figura 11A, 11B, 11C). Por outro lado, o bloqueio do sistema colinérgico muscarínico

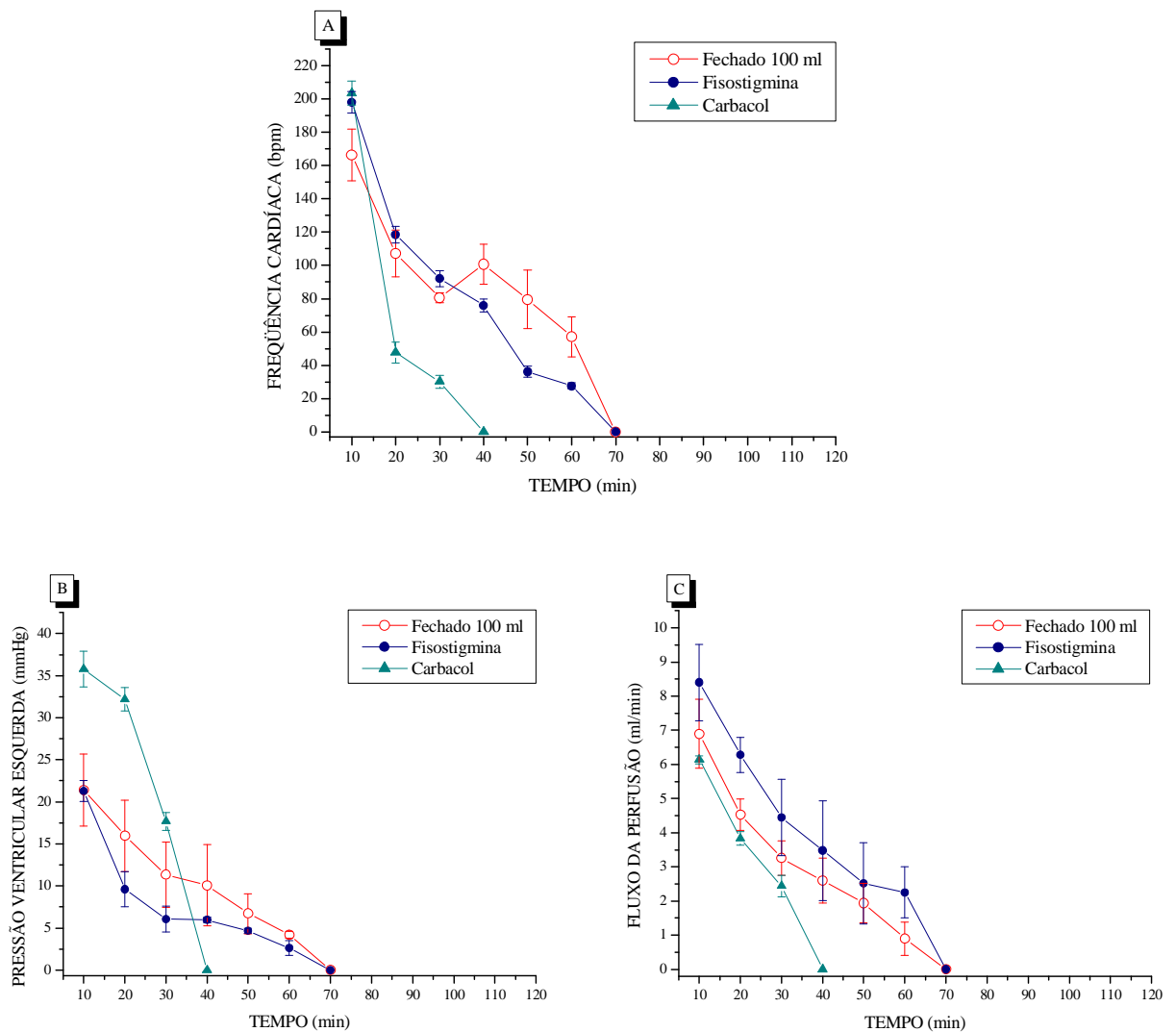


Figura 10: Gráfico ilustrando o comportamento médio (erro padrão) da (A) Freqüência Cardíaca, (B) Pressão Ventricular Esquerda e (C) Fluxo da Perfusão nos grupos “Fechado 100ml”(N=5), “Fisostigmina”(N=5) e “Carbacol”(N=5), ao longo do tempo de experimento.

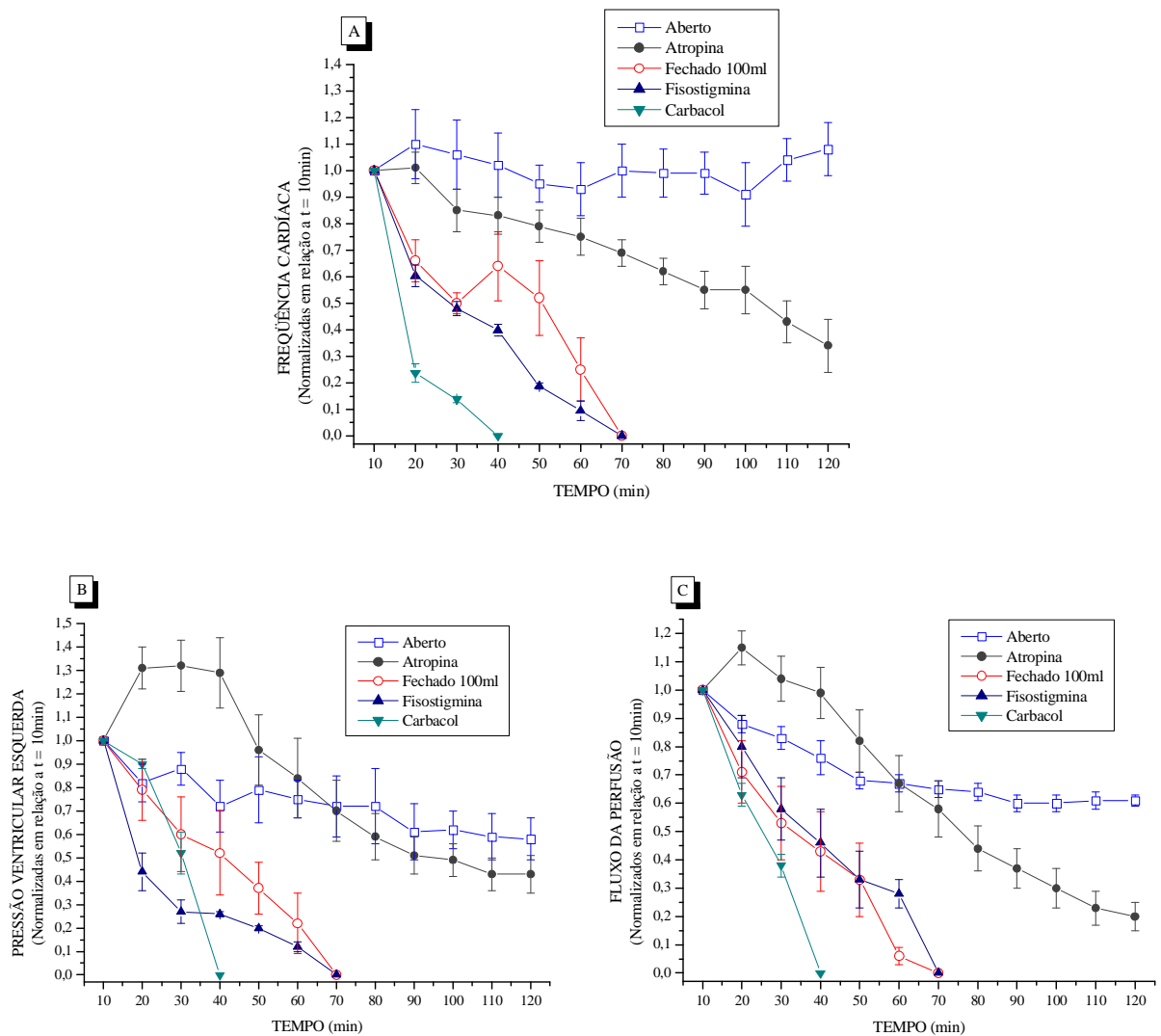


Figura 11: Gráfico ilustrando o efeito do tempo sobre a Frequência Cardíaca média (A), a Pressão Ventricular Esquerda média (B) e o Fluxo da Perfusão médio (C) nos grupos “Aberto” (N=5), “Atropina” (N=7), “Fechado 100ml” (N=5), “Fisostigmina” (N=5) e “Carbacol” (N=5) durante o tempo de experimento.

atenua a queda dos parâmetros cardíacos avaliados em relação à do grupo “*Fechado 100 ml*” (figura 11A, 11B, 11C).

E. Bloqueio do sistema β -Adrenérgico.

Com a finalidade de avaliar se a NA esta promovendo ação sobre o coração isolado de rato em circuito fechado com baixo volume circulante (100ml), bloqueamos o sistema β -Adrenérgico com 1 μ M propranolol (antagonista β -Adrenérgico). Observamos através da figura 12 que os parâmetros decaíram significativamente desde o início do experimento com as seguintes variações: FC de 202 para 58 bpm (figura 12A), PVE de 28,8 para 2,4 mmHg (figura 12B) e o FP de 7,8 para 1,0 ml/min (figura 12C). Assim como na estimulação colinérgica muscarínica, a recuperação transitória na FC que o grupo controle apresenta do 30^o ao 40^o min de experimento não ocorre. Os parâmetros avaliados neste grupo apresentam valores nulos aos 50 min. ou seja, 20 min. antes do grupo controle (fechado 100 ml).

F. Estimulação do sistema β -Adrenérgico.

Ainda com a finalidade de avaliar se a NA esta promovendo ação sobre o coração isolado de rato em circuito fechado com baixo volume circulante (100ml), estimulamos o sistema β -Adrenérgico com 0,01 μ M isoproterenol (agonista β -Adrenérgico)

Na figura 13 ilustra-se que a estimulação do sistema β -Adrenérgico atenuou a queda dos parâmetros cardíacos, pois a FC média apresentada aos 70 min pelo grupo banhado com isoproterenol ainda era de 133 bpm (69% da inicial), e já no grupo controle (fechado 100ml) aos 70 min este parâmetro encontra-se com valores nulos (figura 13A). A PVE média deste grupo variou de 23,8 a 7,2 mmHg, porém aos 70 min. foi de 83% da inicial, enquanto que o grupo controle apresentou valores nulos para o tempo de 70 min. de experimento (figura 13B). Assim como os demais parâmetros o FP também apresentou melhores condições com a realização da estimulação do sistema β -Adrenérgico variando de 8,1 a 3,9 ml/min. durante 120 min de experimento, sendo que aos 70 min. de experimento o grupo controle já apresentava valores nulos do FP e o grupo tratado com isoproterenol ainda mantinha 88,8% do FP inicial (figura 13C).

A mesma estimulação do sistema β -Adrenérgico com isoproterenol foi feita associada com o bloqueio colinérgico muscarínico produzido por 1 μ M de atropina (agonista colinérgico

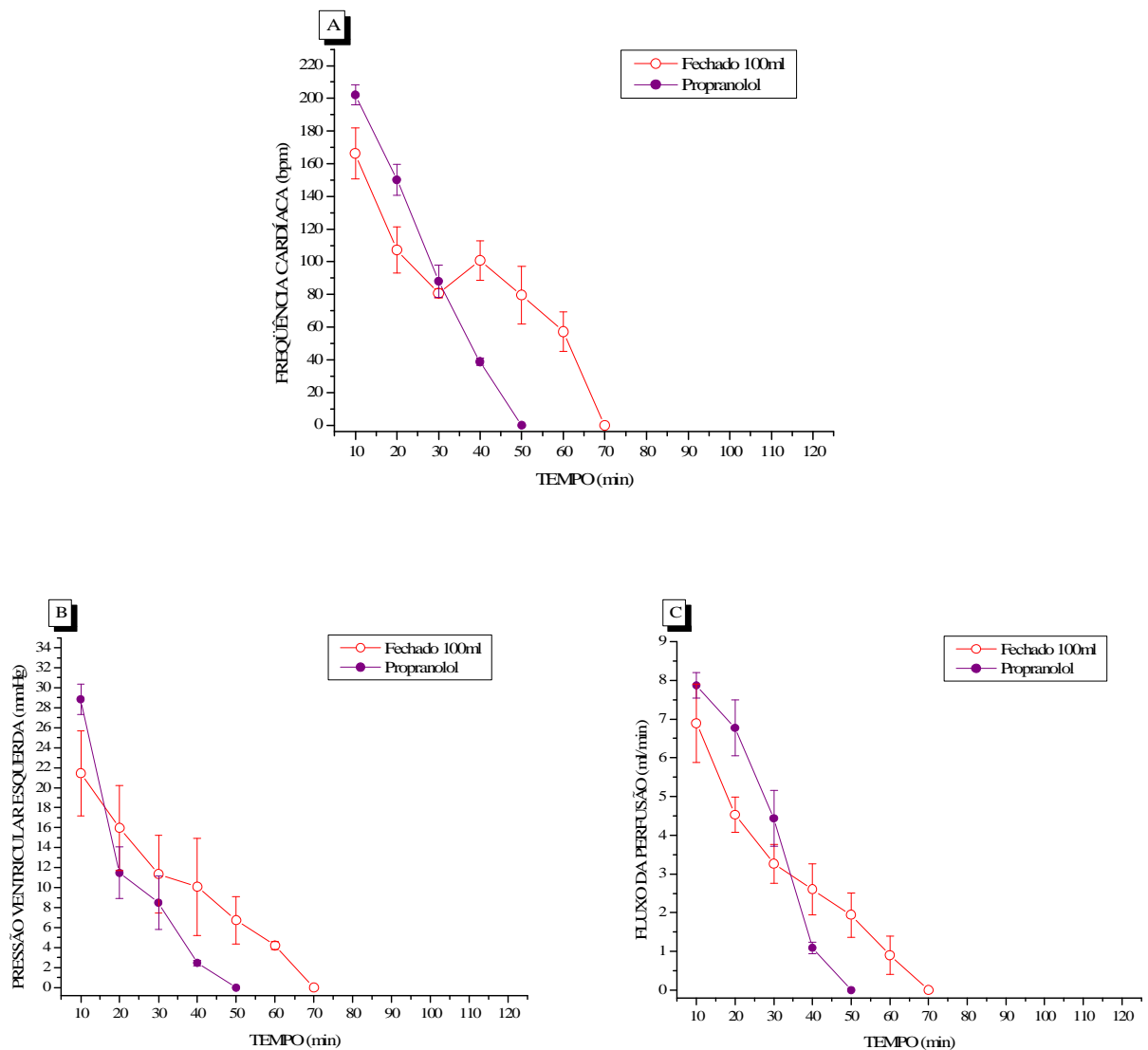


Figura 12: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “Fechado 100ml” (N=5) e “Propranolol” (N=5) ao longo do tempo de experimento.

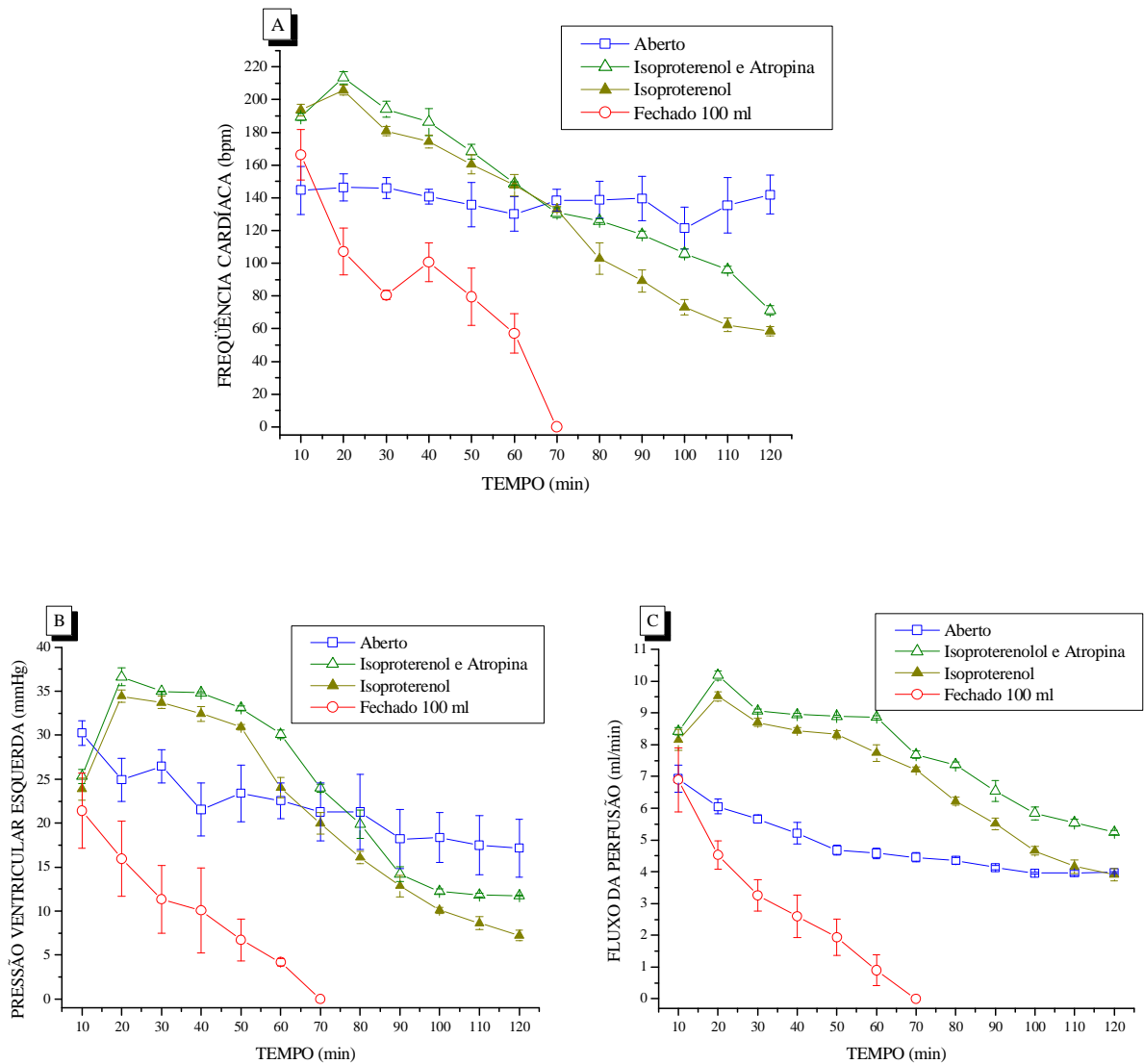


Figura 13: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “Aberto” (N=5), “Isoproterenol e Atropina” (N=3), “Isoproterenol” (N=3) e “Fechado 100ml” (N=5), ao longo do tempo de experimento.

uscarínico) com a finalidade de avaliarmos a ação isolada da NA sobre os parâmetros funcionais de coração isolado de rato com baixo volume circulante. Observamos através da figura 13 que os valores médios dos parâmetros variaram entre: FC 109 a 71 bpm (figura 13A), PVE 25,3 a 11,7 mmHg (figura 13B) e o FP 8,4 a 5,2 ml/min. (figura 13C). Variações estas semelhantes ao grupo “*Atropina*” e “*Isoproterenol*”.

G. Análise qualitativa dos testes realizados com fármacos sobre o sistema β -Adrenérgico.

A figura 14 ilustra todos os parâmetros cardíacos avaliados com uso dos fármacos agonista e antagonista do sistema β -Adrenérgico. Para efeito de clareza, os dados foram normalizados em relação aos dados obtidos no tempo de 10 min. de experimento.

Qualitativamente, a queda dos parâmetros avaliados na condição experimental com estimulação do sistema β -Adrenérgico está atenuada em relação à do grupo “*Fechado 100 ml*” (figura 14A, 14B, 14C). Por outro lado, o bloqueio β -Adrenérgico muscarínico acentua a queda dos parâmetros cardíacos avaliados em relação à do grupo “*Fechado 100 ml*” (figura 14A, 14B, 14C).

H. Estimulação dos receptores nicotínicos nos nervos autonômicos (DMPP).

Com a finalidade de avaliar a integridade pré sináptica do sistema nervoso autonômico realizamos a estimulação deste sistema através da ativação dos receptores Nicotínico pré sinápticos (reguladores da liberação de ACh e NA) com 1 μ M de dimetilfenilpiperazínio – DMPP – (agonista nicotínico). Esta estimulação também foi realizada juntamente com 1 μ M de atropina provocando bloqueio do sistema colinérgico muscarínico.

Na figura 15 apresentam-se os parâmetros cardíacos avaliados nestes grupos experimentais. A estimulação do sistema autonômico cardíaco fica nítida quando observamos a FC média do grupo tratado com 1 μ M de DMPP (figura 15A), pois esta cai nos primeiros 30 min de experimento (efeito inibitório – ACh), estabiliza durante 50 min. e aumenta do 80^o ao 90^o min. de experimento (efeito estimulatório – NA). No grupo tratado com 1 μ M de DMPP mais 1 μ M de Atropina observamos o efeito do bloqueio colinérgico muscarínico, atenuando o efeito inibitório (ACh) inicial.

A PVE, como ilustrado na figura 15B teve uma resposta estimulatório inicial de 10 min. seguida de uma constante queda até os 120 min de experimentos no grupo tratado com

1 μ M de DMPP. Percebemos que a ACh também exerce uma determinada função sobre este parâmetro quando adicionamos juntamente com o DMPP, 1 μ M de Atropina provocando o bloqueio colinérgico muscarínico, acarretando no aumento da resposta estimulatória inicial. O FP ilustrado pela figura 15C ilustra que este segue o mesmo padrão da PVE.

Em relação ao grupo controle “*Fechado 100 ml*” observamos que com a estimulação pelo DMPP atenuamos a queda da funcionalidade cardíaca. Esta resposta torna-se mais evidente quando bloqueamos o sistema colinérgico muscarínico com 1 μ M de atropina na solução de perfusão.

I. Resistência ao fluxo da perfusão.

A média das resistências ao fluxo da perfusão nos grupos “*Aberto*”, “*Fechado*”, “*Atropina*”, “*Fisostigmina*”, “*Carbacol*”, “*Propranolol*”, “*Isoproterenol*”, “*Isoproterenol e Atropina*”, “*DMPP*” e “*DMPP e Atropina*”, foram respectivamente (mmHg x min/ml) 4,5 ($\pm 0,59$), 3,7 ($\pm 0,88$), 3,2 ($\pm 0,60$), 2,1 ($\pm 0,83$), 4,1 ($\pm 0,17$), 2,3 ($\pm 0,32$), 2,9 ($\pm 0,17$), 3,0 ($\pm 0,05$), 3,3 ($\pm 0,77$), 4,0 ($\pm 0,33$). O fato destes dados exibirem baixa variabilidade (média geral de 3,31 $\pm 0,47$) indica que o leito vascular do coração isolado, bem como sua circulação coronariana, mantiveram-se similarmente preservados nos experimentos (vide anexo B).

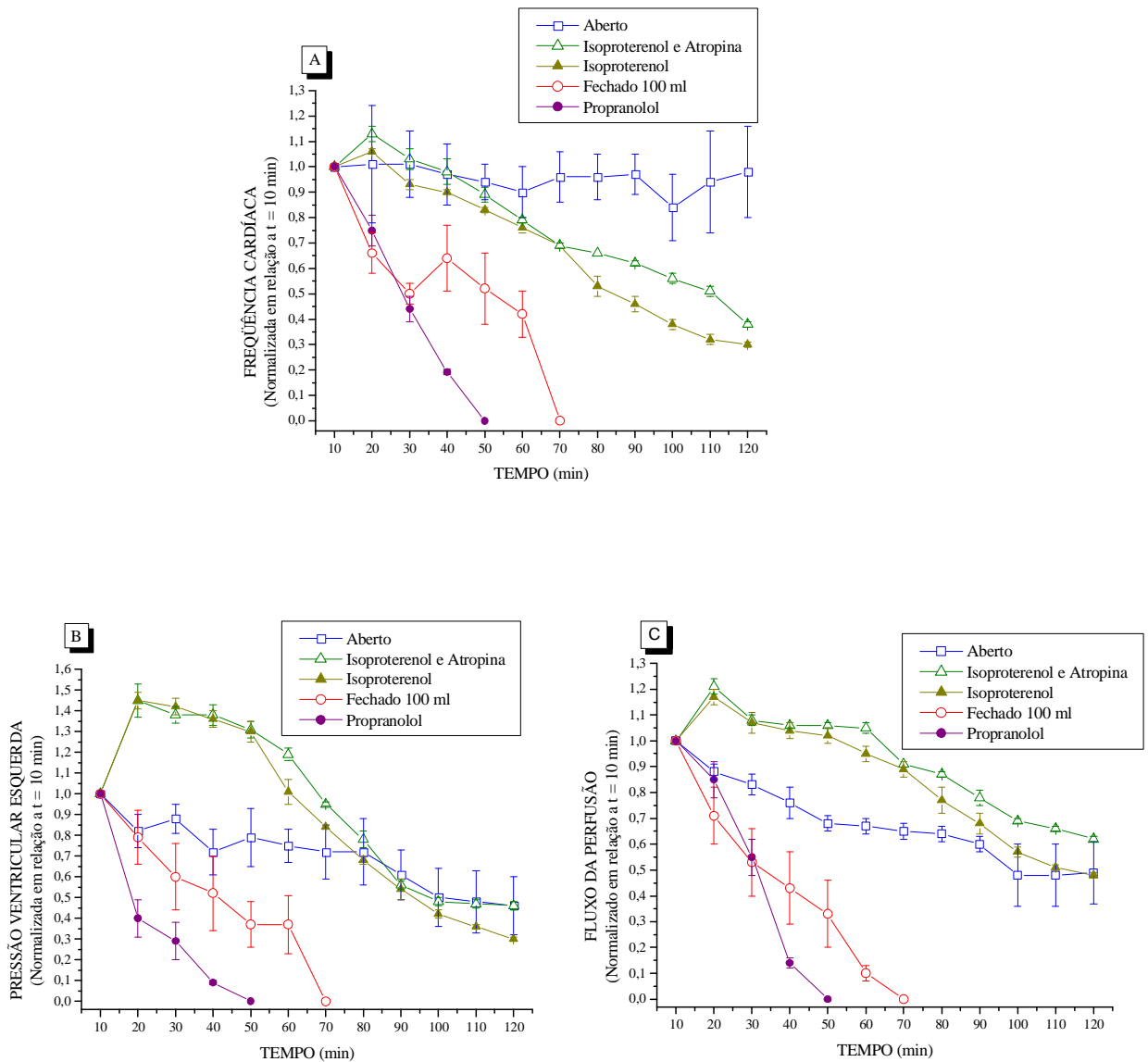


Figura 14: Gráfico ilustrando o efeito do tempo sobre a Frequência Cardíaca média (A), a Pressão Ventricular Esquerda média (B) e o Fluxo da Perfusão médio (C) nos grupos “Aberto” (N=5), “Isoproterenol e Atropina” (N=3), “Isoproterenol” (N=3), “Fechado 100ml” (N=5), e “Propranolol” (N=5), durante o tempo de experimento.

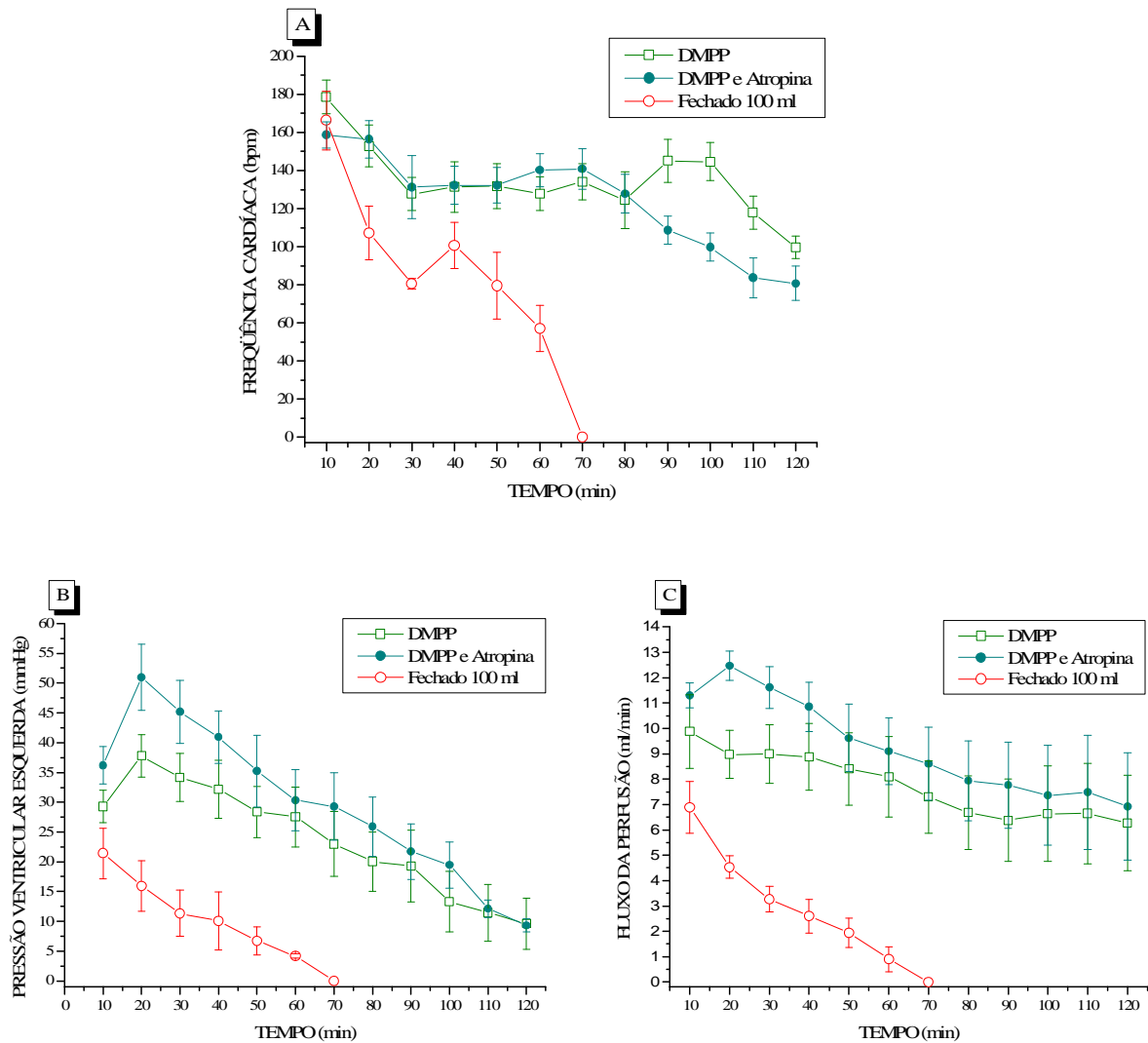


Figura 15: Gráfico ilustrando a média (com erro padrão) da Frequência Cardíaca (A), da Pressão Ventricular Esquerda (B) e do Fluxo da Perfusão (C) nos grupos “DMPP” (N=6), “DMPP e Atropina” (N=6) e “Fechado 100ml” (N=5), ao longo do tempo de experimento.

6 DISCUSSÃO

Em todo o momento neste trabalho buscamos aprofundar nosso conhecimento acerca dos possíveis mecanismos envolvidos na queda dos parâmetros fisiológicos de coração isolado em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml). Em tese, vários fatores poderiam explicar os resultados encontrados por Necchi-Jr (2006), dentre eles o acúmulo de substâncias cardiodepressoras liberadas pelo próprio tecido cardíaco na solução de perfusão. Com isso foi proposto neste trabalho a caracterização dos fatores que poderiam estar envolvidos na queda dos parâmetros cardíacos de coração isolado nestas condições experimentais. Para isso adotamos duas abordagens experimentais: 1ª) análise a funcionalidade do coração perfundido com a solução de perfusão proveniente de outro coração, previamente perfundido em circuito fechado com baixo volume circulante; 2ª) avaliação do efeito de fármacos que interagem com o sistema nervoso autonômico cardíaco.

Resultados deste estudo mostram que: (1) a(s) substância(s) que provoca(m) a queda dos parâmetros cardíacos é (são) liberada(s) pelo próprio coração e mantém-se presente na solução de perfusão, (2) a queda da funcionalidade cardíaca é mediada de maneira importante pelo sistema colinérgico muscarínico, pois o antagonista seletivo (atropina) dos receptores de acetilcolina muscarínicos (mAChR) atenuou e o anti-colinesterásico (Fisostigmina) ou o agonista seletivo dos mAChR (carbacol) potencializou a queda dos parâmetros cardíacos em corações isolados de ratos com baixo volume circulante, (3) o sistema β -adrenérgico cardíaco também tem um papel importante na manutenção dos parâmetros avaliados, pois o agonista seletivo dos β -adrenoceptores (isoproteronol) atenuou e o antagonista seletivo dos β -adrenoceptores (propranolol) intensificou a queda dos parâmetros cardíacos avaliados e (4) o leito vascular e a circulação coronariana do coração isolado estão preservados em todos os experimentos.

No que se refere à consideração da existência de substâncias neuroativas na solução circulante, vale lembrar que Otto Loewi descobriu, ainda em 1921, em ensaios feitos com coração isolado de Batráquio, que o sistema nervoso regulava a função dos órgãos periféricos por meio da liberação de substâncias químicas produzidas pelos nervos autonômicos (neurotransmissores). Nestes ensaios, Loewi montou dois corações isolados em um sistema de perfusão de circulação aberta, similar ao método de Langendorff, porém a solução que banhava o primeiro coração era perfundida no segundo coração em um sistema em cascata (LOEWI & NAVRATIL, 1926). Loewi observou que quando o ramo do nervo vago localizado na parede

externa do coração isolado era estimulado eletricamente, os batimentos espontâneos do coração cessavam, devido a ação de uma substância cardiopressora (vagusstoff). Curiosamente, o mesmo efeito era observado no segundo coração não estimulado eletricamente. Baseado nestes ensaios Loewi propôs que os nervos autonômicos regulavam a função cardíaca e de outros órgãos periféricos por meio da liberação de neurotransmissores. Neste caso, o neurotransmissor vagusstoff descoberto por Loewi era a acetilcolina.

Assim, propusemos experimentos semelhantes ao de Loewi, no qual montamos dois corações de rato em montagem de Langendorff, sendo que o coração 1 (C_1) foi previamente perfundido em circuito fechado (re-circulante) para fornecer a solução de perfusão para o coração (C_2) estabilizado em circuito aberto (não-recirculante). C_1 permaneceu em circuito fechado até visualizarmos o comprometimento da sua funcionalidade, fornecendo então a solução para perfusão de C_2 . Por sua vez, C_2 apresentou acentuada queda da sua funcionalidade já nos primeiros 10 min. de perfusão com a solução proveniente de C_1 , evidenciando que a substância cardiopressora encontrava-se na solução de perfusão.

Em busca de evidências que permitissem identificar a natureza química da substância cardiopressora, testamos possíveis mecanismos envolvidos na queda dos parâmetros fisiológicos do coração em circuito fechado com baixo volume circulante (100 ml). Propusemos investigar se o bloqueio dos receptores da acetilcolina poderia impedir a perda da função cardíaca. De fato, os resultados mostraram que na ausência de bloqueio colinérgico muscarínico há abolição completa dos parâmetros cardíacos após 70 minutos de experimento, o que leva à perda da função cardíaca. Por outro lado, ao fazermos o bloqueio colinérgico muscarínico adicionando atropina à solução de perfusão, os parâmetros cardíacos após 70 minutos ainda representam de 60 a 70% de seu valor inicial (figura 9). Porém, vale ressaltar que as preparações tratadas com atropina não apresentam resultados similares aos do grupo “*Aberto*”, indicando que o bloqueio colinérgico reverte parte da queda dos parâmetros cardíacos de coração isolado em circuito fechado (100 ml).

A reversão de efeitos deletérios ao coração através do bloqueio colinérgico muscarínico também é observada no tecido atrial isolado do rato, notadamente no que se refere a inducibilidade de arritmias. Por exemplo, a inducibilidade de arritmias em átrio direito isolado de rato é abolida quando este é perfundido com $1\mu\text{M}$ de atropina (GODOY, 1999; FARIA, 2004). Estes resultados sugerem que a modulação colinérgica muscarínica desempenha papel importante não só para o coração como um todo, mas também para partes do coração com funções

específicas, como o átrio direito, o qual contém o marca-passo natural do coração (nódulo sinusal).

A queda da funcionalidade cardíaca é claramente potencializada quando estimulamos o sistema colinérgico muscarínico de coração isolado de rato com baixo volume circulante com anti-colinesterázico ou agonista seletivo dos mAChR. Estes resultados corroboram, os de vários estudos que demonstram efeito negativo do sistema colinérgico muscarínico sobre o cronotropismo e ionotropismo cardíaco, através da ligação do neurotransmissor ACh com os receptores muscarínicos (M_2 – maior expressão no tecido cardíaco) inibindo a AC e conseqüentemente a formação de AMPc (CAULFIELD, 1993; NAIR *et. al.*, 1995).

Por outro lado, durante a estimulação do sistema colinérgico muscarínico com a administração de anticolinesterásico (fisostigmina), observamos que o fluxo aumentou em relação ao do grupo “*Fechado 100ml*”. Isso possivelmente ocorreu devido ao mecanismo vasodilatador mediado pela ACh. Como demonstrado por Shibasaki *et al.* (2002), a ACh pode contribuir diretamente para vasodilatação inicial periférica, sendo que, com a inibição da acetilcolinesterase, é potencializada a resposta vasodilatadora inicial. Entretanto, este efeito é abolido com a inibição do Óxido Nítrico (NO) que, aparentemente, contribui aproximadamente para 30% de todas as respostas reflexas vasodilatadoras (KELLOG *et al.* 1998). Com isso levantamos a hipótese de que a ACh desencadeia um papel vasodilatador dependente do endotélio que poderia explicar o aumento do fluxo observado em nossos experimentos.

O que também é interessante ressaltarmos é o fato de que as duas maneiras empregadas para estimulação do sistema colinérgico muscarínico (anticolinesterásico, fisostigmina e agonista seletivo dos mAChR, carbacol) diferem-se significativamente em seus resultados. Isso pode ocorrer devido ao princípio ativo de cada fármaco, pois, a fisostigmina age inibindo a proteína responsável pela degradação da ACh (colinesterase) aumentando sua resposta gradativamente durante o tempo de experimento e o carbacol age diretamente nos receptores mAChR (mimetizando a ACh), e é fornecido inicialmente na concentração desejada ($1\mu\text{M}$) e não sofre degradação, acarretando em uma resposta intensa, contínua e imediata.

A primeira evidência da participação do sistema adrenérgico cardíaco nas condições experimentais de coração isolado em circuito fechado de baixo volume circulante (100 ml), foram percebidas ao analisarmos os resultados do grupo “*C. fechado 100ml*” (controle) e o grupo “*troca de solução*”. Observamos que do 30^o ao 40^o min de experimento ocorre uma recuperação transitória da frequência cardíaca. Mais adiante quando comparamos estes resultados com os

grupos tratados com propranolol (antagonista adrenérgico), carbacol (agonista muscarínico) e fisostigmina (anticolinesterásico), verificamos que esta recuperação não ocorre. Isso pode estar ocorrendo provavelmente devido à degradação da ACh, ou pela integração entre o SNS e SNP. Os resultados dos grupos “DMPP”, “DMPP e Atropina” corroboram esta hipótese, pois é no tempo de 30 min do experimento que ocorre o equilíbrio entre o efeito inibitório (ACh) e o efeito estimulatório (NA) do coração.

A interação entre do SNS e o SNP foi postulada inicialmente por Burn & Rand em 1959 que relataram a possibilidade de que a ACh estivesse envolvida na modulação da transmissão simpática. Em 1968, Burn propôs que terminais nervosos colinérgicos estariam em íntimo contato com terminais nervosos simpáticos. Mais tarde, estudos histológicos mostraram a existência de interações axo-axonais simpato-colinérgicas em vários tecidos, incluindo o coração (KOSTERLITZ *et al.*, 1967; CAMPBELL *et al.*, 1989; CAMPBELL & HODOS, 1970; FURNESS & IWAYAMA, 1972; LINDMAR *et al.*, 1979). A presença de colinoceptores em neurônios simpáticos e adrenoceptores em neurônios colinérgicos em tecidos com interações axo-axonais simpato-colinérgicas permite maior integração entre o SNS e o SNP (BURNSTOCK & COSTA, 1975). Neste caso, as descargas repetitivas dos neurônios colinérgicos produziram concentrações de ACh nas sinapses simpáticas capazes de estimular os colinoceptores nicotínicos facilitatórios da liberação de NA (BURNSTOCK & COSTA, 1975). No coração, demonstrou-se que a ACh liberada dos neurônios colinérgicos pode estimular a liberação de NA mediante a ativação de colinoceptores nicotínicos presentes nos axônios simpáticos (FUDER & MUSCHOLL, 1995).

A participação da NA nas condições experimentais realizadas em nosso estudo fica mais evidente quando analisamos o grupo tratado com agonista seletivo nicotínico (DMPP). Visualizamos nitidamente que durante o tempo de experimento temos ação inicial predominante do sistema colinérgico muscarínico (30 min), seguido de uma estabilização (50 min) e final com predomínio do sistema adrenérgico (10min), evoluindo para constante queda dos parâmetros cardíacos. Percebemos que no grupo tratado com agonista seletivo adrenérgico (isoproterenol) atenuamos significativamente a queda funcional cardíaca. Quando utilizamos o antagonista seletivo adrenérgico (propranolol) acentuamos a queda dos parâmetros cardíacos. Tanto que os corações do grupo tratado com antagonista β -adrenérgico morrem 20 min. antes dos do grupo controle. Isso pode ser explicado pelos amplos resultados já descritos na literatura do efeito positivo sobre o cronotropismo e ionotropismo cardíaco, causado pela estimulação adrenérgica

(BIRKENFELD *et al.*, 2002; WAKITA, 2007). Estes resultados também corroboram os de Dixon em (1924), que através de estudos sobre os efeitos cardíacos da nicotina trouxe as primeiras evidências experimentais da existência de receptores pré sinápticos modulatórios da liberação de neurotransmissores. Este estudo mostrou que a nicotina produzia bradicardia seguida de taquicardia e aumento da força de contração em corações isolados de coelho (DIXON, 1924). Com base nestes resultados, Dixon propôs que a bradicardia era mediada pela liberação de ACh dos terminais colinérgicos devido a ação excitatória da nicotina em gânglios vagais intracardíacos. Por analogia, Dixon propôs que a taquicardia e o aumento da força de contração eram mediados pela liberação de NA dos terminais simpáticos devido à estimulação de gânglios simpáticos intracardíacos pela nicotina. Os estudos histológicos posteriores demonstram a presença de gânglios vagais intracardíacos (BLINDER, *et al.*, 2005), confirmando parcialmente a hipótese proposta por Dixon. Por outro lado, a falta de evidências histológicas da presença dos gânglios simpáticos intracardíacos levou os estudiosos a supor que os efeitos excitatórios da nicotina no coração eram mediados por colinoceptores nicotínicos facilitatórios da liberação de NA localizados nos terminais nervosos simpáticos (LÖFFELHOLZ & MUSCHOLL, 1969; SJOSTRAND, 1973; MCGRATH, 1978). Atualmente, existe ampla documentação da existência de colinoceptores nicotínicos facilitatórios da liberação de NA em terminais nervosos simpáticos (SJOSTRAND, 1973; MCGRATH, 1978; JAYASUNDAR & VOHRA, 1978; LINDAMOOD *et al.*, 1978).

Em vista o exposto acima, parece haver uma competição constante entre o SNS (estimulatório) e SNP (inibitório) durante todo o tempo de experimento com coração isolado de rato com baixo volume de solução circulante (100 ml), porém, com predomínio da resposta inibitória através do sistema colinérgico muscarínico, supostamente devido a maior liberação de ACh na solução circulante. Isso se torna mais evidente quando lembramos que estudos histológicos demonstram a presença de gânglios vagais intracardíacos (TSUBOI *et al.*, 2000; SAMPAIO *et al.*, 2003; BLINDER, *et al.*, 2005). Ou seja, o depósito de ACh junto à inervação intrínseca cardíaca pode ser acentuadamente maior do que a concentração de NA, acarretando assim numa resposta mais acentuada da modulação colinérgica muscarínica causando a queda da funcionalidade cardíaca.

Em última análise, tomando nossos resultados como um todo, entendemos que a principal contribuição deste trabalho se refere à constatação experimental e quantitativa de que o volume circulante tem um papel fundamental na longevidade de corações isolados. Este tipo de

contribuição é de especial importância clínica quando consideramos trabalhos atuais que mostram haver a necessidade de minimizarmos os efeitos prejudiciais na função cardíaca após o implante no seu receptor (SKRZYPIEC-SPRING *et al.*, 2007; FITTON *et al.*, 2004) considerando notadamente que neste processo, o coração é mantido em uma montagem portátil de Langendorff em circuito fechado antes de seu implante (FITTON *et al.*, 2004).

Finalmente, entendemos que a utilização do modelo experimental desenvolvido em nosso laboratório para perfusão de coração em preparação de Langendorff, em circuito fechado, com baixos volumes circulantes, constitui-se ferramenta metodológica útil para contribuir com o aprofundamento do estudo do papel deste tipo de modulação sobre o coração.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que:

- 1) A substância que causa a queda da funcionalidade de corações isolados em circuito fechado com baixo volume circulante está na solução circulante;
- 2) A queda da funcionalidade de corações isolados, nestas condições experimentais, é mediada de maneira importante por mecanismos colinérgicos muscarínicos acionados por substância intrínseca do coração (provavelmente acetilcolina) liberada na solução circulante.
- 3) A sistema β -adrenérgico tem responsabilidade direta sobre a manutenção da funcionalidade cardíaca de corações isolados de ratos com baixo volume circulante, provavelmente acionado pelo seu neurotransmissor (noradrenalina).
- 4) O leito vascular e a circulação coronariana dos corações isolados no método de Langendorff em circuito fechado e aberto estão preservados durante o tempo experimental.
- 5) A abordagem utilizada, ou seja, a de fazer medições fisiológicas do coração em preparação de Langendorff, em circuito fechado, com diferentes volumes circulantes, constitui-se ferramenta metodológica útil para contribuir com o aprofundamento do estudo do papel deste tipo de modulação sobre o coração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCILI, E.A.; PROENZA, C.; BARUSCOTTI, M.; DIFRANCESCO, D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. **News Physiol. Sci.**, v.17, p. 32-37, 2002.

AN, M.Y.; CANEL, E.P.; JANG, I.H.; REVEL, D.; FOSSUM, T.W.; CHUNG, N.S.; JANIER, M.F. Development and evaluation of a new apparatus for continuous perfusion of isolated perfused pig heart. **J. Vet. Sci.**, v.3, n. 3, p. 219-232, 2002.

APRIGLIANO, O.; RYBIN, V.O.; PAK, E.; ROBINSON, R.B.; STEINBERG, S.F. β 1- and β 2-adrenergic receptors exhibit differing susceptibility to muscarinic accentuated antagonism. **Am. J. Physiol.** v.272, p. 2726-2735, 1997.

ARORA, R.C.; HIRSCH, G.M.; JOHNSON, H. K.; HANCOCK, F.C.; ARMOUR, J.A. Function of human intrinsic cardiac neurons in situ. **Amer. J. Physiol Interg Comp Physiol.** v.280, p. 1736-1740, 2001.

BABSKY, E. et al. **Human Physiology**. Moscou: Mir Publishers, pg. 86-14, 1989.

BELEVYCH, A.E.; HARVEY, R.D. Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca^{2+} current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **J. Physiol.** v.528, p. 279-289, 2000.

BELEVYCH, A.E.; SIMS, C.; HARVEY, R.D. ACh-induced rebound stimulation of L-type Ca^{2+} current in guinea-pig ventricular myocytes, mediated by Gbg-dependent activation of adenylyl cyclase. **J. Physiol.** v.536, p. 677-692, 2001.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N., **Fisiologia**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 341-400, 2000.

BIEGON, R.L.; PAPPANO, A.J. Dual mechanism for inhibition of calcium-dependent action potentials by acetylcholine in avian ventricular muscle. Relationship to cyclic AMP. **Circ. Res.** v.46, p. 353-362, 1980.

BIRKENFELD, A.L.; SCHROEDER, C.; BOSCHMANN, M.; TANK, J.; FRANKE, G.; LUFT, F.C.; BIAGGIONI, I.; SHARMA, A.M.; JORDAN, J. Paradoxical effect of sibutramine on autonomic cardiovascular regulation. **Circulation.** v.106, p. 2459-1465, 2002

BRODDE, O.E.; MICHEL, M.C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol. Rev.** v.51, p. 651-690, 1999.

BLINDER, K.; JOHNSON, T.; MASSARI V. Enkephalins and functionally specific vagal preganglionic neurons to the heart: Ultrastructural studies in the cat. **Autonomic Neuroscience.** v.120, p. 52-61, 2005.

BURKE, G.H.; CALARESU, F.R. An experimental analysis of the tachycardia that follows vagal stimulation. **J. Physiol.** v.226, p. 491-510, 1972.

BURNSTOCK, G; COSTA, M. Adrenergic Neurons: their organization, function and development in the peripheral nervous system. **Ed. London Chapman and Hall.** v.126, p. 67-91, 1975.

CAMPBELL, B.G.; SCHERZMW, S.; KEANA, J.F.; WEBER, E. Sigma receptors regulate contractions of the guinea pig ileum longitudinal muscle/myenteric plexus preparation elicited by both electrical stimulation and exogenous serotonin. **J Neurosci.** v.9, p. 3380-3391, 1989.

CAMPBELL, C.B., HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain Behav Evol.** v.3, p. 353-367, 1970.

CARRIÓ, I. Cardiac neurotransmission imaging. **J Nucl Med** v.42, p. 1062-1076, 2001.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther.** v.58, p. 319-379, 1993.

CHENG, Y.N.; AOMINE, M.; ARITA, M. Acetylcholine reverses isoproterenol-induced depression of Vmax in residual Na channel-dependent action potentials of guinea-pig cardiac muscles. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v.23, p. 537-549, 1991.

DAE, M.W.; O'CONNELL, J.; BOTVINICK, E.H. *et al.* Scintigraphic assessment of regional cardiac innervation. **Circulation.** v.79, p. 634-644, 1989

DASCAL, N. Signalling via the G protein-activated K channels. **Cell Signal.** v.9, p. 551-573, 1997.

DHEIN, S.; VAN KOPPEN, C.J.; BRODDE, O.E. Muscarinic receptors in the mammalian heart. **Pharmacol Res.** v.44, p. 161-182, 2001.

DIFRANCESCO, D.; TORTORA, P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. **Nature.** v.351, p. 145-147, 1991.

DIXON, W.E. Nicotin, coniin, pieridin, cytisin, loselin, spartein, gelsemon. In: Heffeter (Ed.), **Handbook Der Experimentallen Pharmakologie.** v.II, p.656-736, Springer, Berlin, 1924.

DOBSAK, P.; COURDEROT-MASUYER, C.; ZELLER, M.; VERGELY, C.; LAUBRIET, A.; ASSEM, M.; *et al.* Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. **Journal of Cardiovascular Pharmacology,** v.34, p. 651-659, 1999.

DORING, H. J.; DEHNERT, H. The isolated perfused heart according to Langendorff. **BiomesstechnikVerlag.** v.24, p. 1170-1176, 1987.

DUCHATELLE-GOURDON, I.; HARTZELL, H.C.; LAGRUTTA, A.A. Modulation of the delayed rectifier potassium current in frog cardiomyocytes by β -adrenergic agonists and magnesium. **J. Physiol.** v.415, p. 251-274, 1989.

FARIA, D.M. Desenvolvimento de modelo experimental para o estudo do efeito da estimulação colinérgica sobre arritmias induzidas em átrios direitos isolados de ratos em diferentes idades. **Dissertação** – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 2004.

FITTON, T. P.; WEI, C.; LIN, R.; BETHEA, B.T.; BARREIRO, C.J.; AMADO, L., *et al.* Impact of 24 h continuous hypothermic perfusion on heart preservation by assessment of oxidative stress. **Clinical Transplantation.** v.18, p. 22-27, 2004.

FLEMING, J.W.; WISLER, P.L.; WATANABE, A.M. Signal transduction by G proteins in cardiac tissues. **Circulation.** v.85, 420-433, 1992.

FUDER, H., MUSCHOLL, E. Heteroreceptor-mediated modulation of noradrenaline and acetylcholine release from peripheral nerves. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v.126, p. 265-412, 1995.

FURNESS, J.B., IWAYAMA, T. The arrangement and identification of axons innervating the vas deferens of the guinea-pig. **J Anat.** v.113, p.179-196, 1972.

GALLO, M.P.; ALLOATTI, G.; EVA, C; OBERTO, A.; LEVI, R.C. M_1 muscarinic receptors increase calcium current and phosphoinositide turnover in guinea-pig ventricular cardiocytes. **J. Physiol.** v.471, p. 41-60, 1993.

GOAILLARD, J.M.; VINCENT, P.V.; FISCHMEISTER, R. Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca^{2+} current in single frog ventricular myocytes. **J. Physiol.** v.530, p. 79-91, 2001.

GODOY, C.M.G. *et al.* Role of Acetylcholine in Electrical Stimulation Induced Arrhythmia in Rat Isolated Atria. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** v.34, p. 475-479, 1999.

GRANGER, H. J. Cardiovascular physiology in the twentieth century: great strides and missed opportunities. **American Journal of Physiology.** v.275, p.1925-1936, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J.D. **Tratado de Fisiologia Médica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, pg. 99-113, 1997.

HARTZELL, H.C. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v.52, p. 165-247, 1988.

HARVEY, R.D.; BELEVYCH, A.E. Muscarinic regulation of cardiac ion channels. **British Journal of Pharmacology.** v.139, p. 1074-1084, 2003.

HAZEKI, O.; UI, M. Modification by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. **J. Biol. Chem.** v.256, p. 2856-2862, 1981.

HILL, A.J.; LASKE, T.G.; COLES-JR, J.A.; SIGG, D.C.; SKADSBERG, N.D.; VINCENT, S.A.; SOULE, C.L.; GALLAGHER, W.J.; IAIZZO, P.A. In vitro studies of human hearts. **Ann. Thorac. Surg.**, v.79, p. 168-177, 2005.

HWANG, T.C.; HORIE, M.; NAIRN, A.C.; GADSBY, D.C. Role of GTP-binding proteins in the regulation of mammalian cardiac chloride conductance. **J. Gen. Physiol.** v.99, p. 465-489, 1992.

ISHIKAWA, Y.; HOMCY, C.J. The adenylyl cyclases as integrators of transmembrane signal transduction. **Circ. Res.** v.80, p. 297-304, 1997.

JAYASUNDAR, S., VOHRA, M.M. An analysis of action of nicotinic agents on adrenergic nerve terminals in rat isolated vas deferens. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v.232, p.192-201, 1978.

JUREVICIUS, J.; FISCHMEISTER, R. Acetylcholine inhibits Ca^{2+} current by acting exclusively at a site proximal to adenylyl cyclase in frog cardiac myocytes. **J. Physiol.** v.491.3, p. 669-675, 1996.

KAWASHIMA, T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. **Anat. Embryol.** v.6, p. 425-438, 2005.

KELLOGG, W.L. Control of heat-induced cutaneous vasodilatation in relation to age. **Eur. J. Appl. Physiol.** v.57, p. 120-125, 1998.

KOSTERLITZ, H.W.; LEES, G.M.; WALLIS, DI. Potentials recorded from the isolated superior cervical ganglion of the rabbit. **J Physiol.** v.188, p.11, 1967.

KUKANOVA, B.; MRAVEC, B. Complex intracardiac nervous system. **Bratisl Lek Listy**, v. 107, p. 45-51, 2006.

KUROKAWA, J.; CHEN, L.; KASS, R.S. Requirement of subunit expression for cAMP-mediated regulation of a heart potassium channel. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.100, p. 2122-2127, 2003.

LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. **Pflügers Archiv**, v.61, p. 291-332, 1898.

LEVY, M.N. Neural control of the heart: the importance of being ignorant. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** v.6, p. 283-293, 1995.

LEVY, M.N. Sympathetic – parasympathetic interactions in the heart. **Circ. Res.** v.29, p. 437-445, 1971.

LINDAMOOD, C., JOHNSON, S.M., FLEMING, W.W. Dual excitatory of acetylcholine in the mouse vas deferens. **Proc Soc Exp Biol Med.** v.157, p. 200-201, 1978.

LINDMAR, R., LOFFELHOLZ, K., WEIDE, W. Inhibition by pentobarbital of the acetylcholine release from the postganglionic parasympathetic neuron of the heart. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 210, p.166-173, 1979.

LOEB, J.M.; VASSALLE, M. Adrenergic mechanisms in postvagal tachycardia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.210, p. 56-63, 1979.

LOEWI O, NAVRATIL E. Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. X mittellung. über das schickal des vagustoff. **Pflugers Arch. Gesante Physiol.** v.214, p. 678-688, 1926.

LÖFFELHOLZ, K., MUSCHOLL, E. Inhibitory effect of acetylcholine on the release of noradrenaline from isolated rabbit hearts stimulated sympathetically. **Naunyn Schmied Arch Exp Pathol Pharmacol.** v.263, p. 236-237, 1969.

LÖFFELHOLZ, K.; PAPPANO, A.J.. The parasympathetic neuroeffector junction of the heart. **Pharmacol. Rev.** v.37, 1-24, 1985.

MARK, M.D.; HERLITZE, S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K⁺ channels. **Eur. J. Biochem.** v.267, p. 5830-5836, 2000.

MARX, S.O.; KUROKAWA, J.; REIKEN, S.; MOTOIKE, H.; D'ARMIENTO, J.; MARKS, A.R.; KASS, R.S. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. **Science.** v.295, p. 496-499, 2002.

MCDONALD, T.F.; PELZER, S.; TRAUTWEIN, W.; PELZER, D.J. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. **Physiol Rev.** v.74, p. 365-507, 1994.

MCDUGALL, A.J.; MCLEOD, J.G. Autonomic neuropathy. I. Clinical features, investigation, pathophysiology, and treatment. **J Neurol Sci.** v.137, p. 79-88, 1996.

MCGRATH, J.C. Adrenergic and 'non-adrenergic' components in the contractile response of the vas deferens to a single indirect stimulus. **J Physiol.** v. 283, p. 23-39, 1978.

MÉRY, P.F.; ABI-GERGES, N.; VANDECASTEELE, G.; JUREVICIUS, J.; ESCHENHAGEN, T.; FISCHMEISTER, R. Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes. **Life Sci.** v.60, p. 1113-1120, 1997.

MURAD, F.; CHI, Y.-M.; RALL, T.W.; SUTHERLAND, E.M. Adenyl cyclase III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3':5' phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. **J. Biol. Chem.** v.237, p. 1233-1238, 1962.

NAIR, L.A, INGLESE, J, STOFFEL, R, KOCH, W.J, LEFKOWITZ, R.J, KWATRA, M.M, GRANT, A.O. Cardiac muscarinic potassium channel activity is attenuated by inhibitors of Gβγ. **Cir Res.** v. 22, p. 832-838, 1995.

NECCHI JÚNIOR, J. A. Sistema de recirculação a vácuo para montagem experimental de Langendorff. **Dissertação** - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 2006.

NECCHI JÚNIOR, J. A.; OLIVEIRA, M. M.; DE GODOY, C. M. G. Dispositivo para Recirculação de Solução à Vácuo para Montagem Experimental de Langendorff. In: CBEB 2006, Águas de São Pedro. **Anais do CBEB**, 2006.

OHNO, N.; FEDAK, P. W.; WEISEL, R. D.; MICKLE, D. A.; FUJII, T.; LI, R. K. Transplantation of cryopreserved muscle cells in dilated cardiomyopathy: effects on left ventricular geometry and function. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.126, p. 1537-1548, 2003.

ONO, K.; FOZZARD, H.A.; HANCK, D.A. Mechanism of cAMP-dependent modulation of cardiac sodium channel current kinetics. **Circ. Res.** v.72, p. 807-815, 1993.

PATTERSON, S. W.; STARLING, E. H. On the mechanical factors which determine the output of the ventricles. **Journal of Physiology**. v.48, p. 357-379, 1914.

POKROVSKII, V.M. Hierarchy of the heart rhythmogenesis levels is a factor in increasing the reliability of cardiac activity. **Med. Hypotheses**. v.66, p. 158-164, 2006

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S. M. Neuroscience, In: **III Movement and Its Central Control**, 2 ed. Sunderland: USA, 2001

SAMPAIO, K.N.; MAUAD, H.; SPYER, K.M.; FORD, T.W. Differential chronotropic and dromotropic responses to focal stimulation of cardiac vagal ganglia in the rat. **Exp. Physiol.** v.88, p. 315-327, 2003.

SHEN, J.B.; PAPPANO, A.J. On the role of phosphatase in regulation of cardiac L-type calcium current by cyclic GMP. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.301, p. 501-506, 2002.

SHI, H.; WANG, H.; WANG, Z. Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. **Mol. Pharmacol.** v.55, p. 497-507, 1999.

SHIBASAKI, M.; WILSON, T.E.; CUI, J.; CRANDALL, C.G. Acetylcholine release from cholinergic nerves contributes to cutaneous vasodilation during heat stress. **J. Appl. Physiol.** v. 93, p. 1947-1951, 2002.

SJOSTRAND, N.O. Effects of acetylcholine and some other smooth muscle stimulants on the electrical and mechanical responses of the guinea-pig vas deferens to nerve stimulation. **Acta Physiol Scand.** v.89, p 1-9, 1973.

SKRZYPIEC-SPRING, M.; GROTHUS, B., SZELAĞ, A.; SCHULZ, R. Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.55, p. 113-126, 2007.

SMIT, M.J.; IYENGAR, R. Mammalian adenylyl cyclases. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein. Res.** v.32, p. 1-21, 1998.

STANDISH, A.; ENQUIST, L.W.; SCHWABER, J.S. Innervation of the heart and its central medullary origin defined by viral tracing. **Science.** v.263, p. 232-234, 1994.

STARLING, E. H.; VISSCHER, M. B. The regulation of the energy output of the heart. **Journal of Physiology.** v.62, p. 243-261, 1927.

STEMMER, P.M.; LEDYARD, T.H.; WATANABE, A.M. Protein dephosphorylation rates in myocytes after isoproterenol withdrawal. **Biochem. Pharmacol.** v.59, p. 1513-1519, 2000.

TAEGTMEYER, H. One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism. **Canadian Journal of Cardiology.** v.11, p. 1030-1035, 1995.

TEVAEARAI, H. T.; WALTON, G. B.; ECKHART, A. D.; KEYS, J. R.; KOCH, W. J. Donor heart contractile dysfunction following prolonged ex vivo preservation can be prevented by gene-mediated beta-adrenergic signaling modulation. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery,** v.22, p. 733-737, 2002.

TORTORA, G.J.; GRABAWSKI, S.R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TRAUTWEIN, W.; CAVALIE, A.; FLOCKERZI, V.; HOFMANN, F.; PELZER, D. Modulation of calcium channel function by phosphorylation in guinea pig ventricular cells and phospholipids bilayer membranes. **Circ. Res.,** v.61 (Suppl I), p. 17-23, 1987.

TSIEN, R.W. Cyclic AMP and contractile activity in heart. **Adv. Cyclic Nucleotide Res.** v.8, p. 363-420, 1977.

TSUBOI, M.; FURUKAWA, Y.; NAKAJIMA, K.; KUROGOUCHI, F.; CHIBA, S. Inotropic, chronotropic, and dromotropic effects mediated via parasympathetic ganglia in the dog heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.279, p.1201-1207, 2000

VANDECASTEELE, G.; ESCHENHAGEN, T.; FISCHMEISTER, R. Role of the NO-cGMP pathway in the muscarinic regulation of the L-type Ca²⁺ current in human atrial myocytes. **J. Physiol.** v.506 (Part 3), p. 653-663, 1998.

WAKITA, Y. Inotropic, chronotropic, and arrhythmogenic effects of dopamine on the isolated working heart of rabbit. **J Physiol Sci.** v.57, p.147-157, 2007.

WANG, Q. D.; TOKUNO, S.; VALEN, G.; SJOQUIST, P. O.; THOREN, P. Cyclic fluctuations in the cardiac performance of the isolated Langendorff-perfused mouse heart: pyruvate abolishes the fluctuations and has an anti-ischaemic effect. **Acta Physiologica Scandinavica,** v.175, p. 279-287, 2002.

ZACCOLO, M.; POZZAN, T. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. **Science**. v.295, p. 1711-1715, 2002.

ZIMMER, H. G. Modifications of the isolated frog heart preparation in Carl Ludwig's Leipzig Physiological Institute: relevance for cardiovascular research. **Canadian Journal of Cardiology**. v.16, p. 61-69, 2000.

ZIMMER, H. G. The isolated perfused heart and its pioneers. **News in Physiological Sciences**, v.13, p. 203-210, 1998.

ANEXO A - dados referentes à média da Frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo da perfusão nos diversos grupos experimentais.

Em anexo encontramos os dados referentes à média com erro padrão da Frequência Cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo nos diversos grupos experimentais.

Como observamos nas tabelas 1, 2 e 3 os valores médios com erro padrão da frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo respectivamente, apresentado pelo grupo “Troca de Solução” a cada 10 min de experimento durante o tempo de 2 horas.

Nas tabelas 4, 5 e 6 (frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo) encontramos os valores médios com erro padrão referentes aos grupos “DMPP” e “DMPP e Atropina” durante o tempo experimental.

Nas tabelas 7, 8 e 9 (frequência cardíaca, pressão ventricular esquerda e fluxo) encontramos os valores médios com erro padrão referentes aos grupos tidos como controle “C. aberto”, “C. fechado 100 ml” e os demais grupos onde hora sofreram bloqueio ou estimulação colinérgica muscarínica e sistema β -adrenérgico.

Tabela 1: Frequência cardíaca (bpm) média (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C₁ (bpm)	C₂ (bpm)
10	152 ($\pm 4,4$)	-
20	109 ($\pm 3,1$)	-
30	79 ($\pm 4,9$)	193 ($\pm 2,8$)
40	93 ($\pm 4,4$)	188 ($\pm 5,2$)
50	50 ($\pm 1,7$)	186 ($\pm 2,9$)
60	69 ($\pm 9,1$)	93 ($\pm 4,6$)
70	58 ($\pm 5,8$)	55 ($\pm 1,4$)
80	54 ($\pm 7,9$)	0
90	50 ($\pm 10,0$)	-
100	52 ($\pm 11,2$)	-
110	51 ($\pm 10,9$)	-
120	48 ($\pm 10,6$)	-

Tabela 2: Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C₁ (mmHg)	C₂ (mmHg)
10	25,2 ($\pm 1,0$)	-
20	23,3 ($\pm 2,0$)	-
30	17,8 ($\pm 0,8$)	36,9 ($\pm 0,7$)
40	15,8 ($\pm 0,3$)	35,8 ($\pm 0,4$)
50	10,5 ($\pm 1,1$)	35,4 ($\pm 0,2$)
60	5,9 ($\pm 0,5$)	5,2 ($\pm 0,7$)
70	5,3 ($\pm 0,7$)	2,0 ($\pm 0,4$)
80	5,4 ($\pm 1,0$)	0
90	5,1 ($\pm 1,0$)	-
100	5,1 ($\pm 0,9$)	-
110	4,7 ($\pm 0,7$)	-
120	4,4 ($\pm 0,7$)	-

Tabela 3: Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) do grupo “Troca de Solução” durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C₁ (ml/min)	C₂ (ml/min)
10	6,3 ($\pm 0,1$)	-
20	2,8 ($\pm 0,1$)	-
30	2,6 ($\pm 0,3$)	7,3 ($\pm 0,2$)
40	2,0 ($\pm 0,3$)	7,0 ($\pm 0,2$)
50	1,3 ($\pm 0,1$)	6,8 ($\pm 0,3$)
60	1,3 ($\pm 0,1$)	0,8 ($\pm 0,1$)
70	1,2 ($\pm 0,1$)	0,4 ($\pm 0,08$)
80	1,1 ($\pm 0,1$)	0
90	1,2 ($\pm 0,2$)	-
100	1,2 ($\pm 0,2$)	-
110	1,1 ($\pm 0,1$)	-
120	1,0 ($\pm 0,1$)	-

Tabela 4: Frequência cardíaca (bpm) média (erro padrão) dos grupos “DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.

<i>TEMPO</i>	<i>Dmpp 1μM</i>	<i>Dmpp e Atropina 1μM</i>
10	178 (\pm 9,0)	158 (\pm 6,8)
20	152 (\pm 11,0)	156 (\pm 9,9)
30	127 (\pm 8,6)	131 (\pm 16,6)
40	131 (\pm 13,4)	132 (\pm 10,0)
50	131 (\pm 11,7)	132 (\pm 9,2)
60	127 (\pm 8,9)	140 (\pm 8,6)
70	134 (\pm 9,5)	140 (\pm 10,7)
80	124 (\pm 14,8)	127 (\pm 10,2)
90	145 (\pm 11,3)	108 (\pm 7,2)
100	144 (\pm 10,0)	99 (\pm 7,3)
110	117 (\pm 8,6)	83 (\pm 10,3)
120	99 (\pm 5,8)	80 (\pm 9,0)

Tabela 5: Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) dos grupos “DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.

<i>TEMPO</i>	<i>Dmpp 1μM</i>	<i>Dmpp e Atropina 1μM</i>
10	29,2 (\pm 2,7)	36,1 (\pm 3,1)
20	37,8 (\pm 3,5)	50,9 (\pm 5,5)
30	34,1 (\pm 4,0)	45,1 (\pm 5,3)
40	32,2 (\pm 4,8)	40,9 (\pm 4,4)
50	28,3 (\pm 4,2)	35,2 (\pm 5,9)
60	27,5 (\pm 5,0)	30,3 (\pm 5,1)
70	22,9 (\pm 5,4)	29,2 (\pm 5,6)
80	20,0 (\pm 4,9)	25,9 (\pm 4,9)
90	19,2 (\pm 6,0)	21,7 (\pm 4,6)
100	13,2 (\pm 5,0)	19,4 (\pm 3,8)
110	11,4 (\pm 4,7)	12,1 (\pm 1,4)
120	9,6 (\pm 4,3)	9,3 (\pm 1,1)

Tabela 6: Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) dos grupos “DMPP 1 μ M” e “DMPP e Atropina 1 μ M”. durante o tempo (min) experimental.

TEMPO	Dmpp 1μM	Dmpp e Atropina 1μM
10	9,8 (\pm 1,4)	11,3 (\pm 0,4)
20	8,9 (\pm 0,9)	12,4 (\pm 0,5)
30	8,9 (\pm 1,1)	11,6 (\pm 0,8)
40	8,8 (\pm 1,3)	10,8 (\pm 0,9)
50	8,4 (\pm 1,4)	9,6 (\pm 1,3)
60	8,1 (\pm 1,5)	9,1 (\pm 1,3)
70	7,3 (\pm 1,4)	8,6 (\pm 1,4)
80	6,6 (\pm 1,4)	7,9 (\pm 1,5)
90	6,3 (\pm 1,6)	7,7 (\pm 1,7)
100	6,6 (\pm 1,8)	7,3 (\pm 1,9)
110	6,6 (\pm 1,9)	7,4 (\pm 2,2)
120	6,2 (\pm 1,8)	6,9 (\pm 2,1)

Tabela 7: Frequência cardíaca (bpm) média (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C. Aberto (bpm)	Fechado 100 ml (bpm)	Atropina (bpm)	Fisostigmina (bpm)	Carbacol (bpm)	Propranolol 1μM (ml/min)	Isoproterenol (ml/min)	Isoproterenol e Atropina 1μM (ml/min)
10	144 (\pm 14,7)	166 (\pm 15,4)	188 (\pm 14,1)	198 (\pm 6,4)	203 (\pm 7,2)	202 (\pm 6,1)	193 (\pm 3,6)	189 (\pm 2,0)
20	146 (\pm 8,3)	107 (\pm 14,1)	185 (\pm 10,8)	118 (\pm 5,0)	47 (\pm 6,3)	150 (\pm 9,5)	205 (\pm 3,0)	213 (\pm 3,8)
30	145 (\pm 6,4)	80 (\pm 2,7)	155 (\pm 9,3)	92 (\pm 4,9)	30 (\pm 3,9)	88 (\pm 9,9)	180 (\pm 2,7)	194 (\pm 4,9)
40	140 (\pm 4,5)	100 (\pm 12,0)	152 (\pm 12,2)	75 (\pm 4,0)	0	38 (\pm 2,2)	174 (\pm 3,9)	186 (\pm 8,3)
50	135 (\pm 13,7)	79 (\pm 17,5)	147 (\pm 12,4)	36 (\pm 3,2)	-	0	160 (\pm 5,7)	168 (\pm 4,4)
60	130 (\pm 10,4)	57 (\pm 12,1)	139 (\pm 14,3)	27 (\pm 1,7)	-	-	147 (\pm 6,6)	148 (\pm 0,9)
70	138 (\pm 6,7)	0	129 (\pm 12,2)	0	-	-	133 (\pm 1,7)	130 (\pm 3,0)
80	138 (\pm 11,2)	-	118 (\pm 15,2)	-	-	-	102 (\pm 9,5)	125 (\pm 1,1)
90	139 (\pm 13,6)	-	103 (\pm 15,6)	-	-	-	89 (\pm 6,8)	117 (\pm 2,1)
100	121 (\pm 12,8)	-	100 (\pm 15,9)	-	-	-	73 (\pm 4,8)	106 (\pm 2,7)
110	135 (\pm 17,0)	-	83 (\pm 18,3)	-	-	-	62 (\pm 4,1)	96 (\pm 2,2)
120	142 (\pm 11,7)	-	67 (\pm 20,4)	-	-	-	58 (\pm 2,7)	71 (\pm 2,9)

Tabela 8: Pressão ventricular esquerda (mmHg) média (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C. Aberto (mmHg)	Fechado 100 ml (mmHg)	Atropina (mmHg)	Fisostigmina (mmHg)	Carbacol (mmHg)	Propranolol 1μM (mmHg)	Isoproterenol (mmHg)	Isoproterenol e Atropina 1μM (mmHg)
10	30,2 (\pm 1,4)	21,4 (\pm 4,2)	15,9 (\pm 2,2)	21,2 (\pm 1,2)	35,7 (\pm 2,1)	28,8 (\pm 1,5)	23,8 (\pm 1,2)	25,3 (\pm 0,8)
20	24,9 (\pm 2,4)	15,9 (\pm 4,2)	20,0 (\pm 2,4)	9,6 (\pm 2,0)	32,2 (\pm 1,4)	11,4 (\pm 2,5)	34,4 (\pm 0,7)	36,6 (\pm 1,0)
30	26,4 (\pm 1,8)	11,3 (\pm 3,8)	21,0 (\pm 3,8)	6,0 (\pm 1,5)	17,6 (\pm 1,0)	8,4 (\pm 2,7)	33,7 (\pm 0,7)	34,9 (\pm 0,02)
40	21,5 (\pm 3,0)	10,0 (\pm 4,8)	20,7 (\pm 4,5)	5,9 (\pm 0,3)	0	2,4 (\pm 0,2)	32,4 (\pm 0,8)	34,8 (\pm 0,09)
50	23,3 (\pm 3,2)	6,7 (\pm 2,3)	14,3 (\pm 2,4)	4,6 (\pm 0,3)	-	0	30,9 (\pm 0,3)	33,0 (\pm 0,2)
60	22,5 (\pm 2,0)	4,2 (\pm 0,4)	12,1 (\pm 2,1)	2,6 (\pm 0,8)	-	-	24,0 (\pm 1,1)	30,1 (\pm 0,5)
70	21,2 (\pm 3,2)	0	10,9 (\pm 2,8)	0	-	-	19,9 (\pm 1,2)	23,9 (\pm 0,4)
80	21,2 (\pm 4,2)	-	9,3 (\pm 2,3)	-	-	-	16,1 (\pm 0,7)	19,8 (\pm 1,5)
90	18,2 (\pm 3,3)	-	7,8 (\pm 1,6)	-	-	-	12,8 (\pm 1,2)	14,1 (\pm 0,8)
100	18,3 (\pm 2,8)	-	7,7 (\pm 1,5)	-	-	-	10,1 (\pm 0,3)	12,2 (\pm 0,2)
110	17,5 (\pm 3,3)	-	6,9 (\pm 1,6)	-	-	-	8,6 (\pm 0,7)	11,8 (\pm 0,2)
120	17,1 (\pm 3,3)	-	7,0 (\pm 1,7)	-	-	-	7,2 (\pm 0,6)	11,7 (\pm 0,08)

Tabela 9: Fluxo (ml/min) médio (erro padrão) nos diferentes grupos durante o tempo (min) experimental.

TEMPO (min)	C. Aberto (ml/min)	Fechado 100 ml (ml/min)	Atropina (ml/min)	Fisostigmina (ml/min)	Carbacol (ml/min)	Propranolol 1μM (ml/min)	Isoproterenol (ml/min)	Isoproterenol e Atropina 1μM (ml/min)
10	6,9 (\pm 0,4)	6,8 (\pm 1,0)	7,4 (\pm 0,6)	8,4 (\pm 1,1)	6,1 (\pm 0,1)	7,8 (\pm 0,3)	8,1 (\pm 0,3)	8,4 (\pm 0,1)
20	6,0 (\pm 0,2)	4,5 (\pm 0,4)	8,4 (\pm 0,5)	6,2 (\pm 0,5)	3,8 (\pm 0,2)	6,7 (\pm 0,7)	9,5 (\pm 0,1)	10,1 (\pm 0,1)
30	5,6 (\pm 0,1)	3,2 (\pm 0,5)	7,6 (\pm 0,7)	4,4 (\pm 1,1)	2,4 (\pm 0,3)	4,4 (\pm 0,7)	8,7 (\pm 0,1)	9,0 (\pm 0,05)
40	5,2 (\pm 0,3)	2,6 (\pm 0,6)	7,4 (\pm 0,9)	3,4 (\pm 1,4)	0	1,0 (\pm 0,1)	8,4 (\pm 0,09)	8,9 (\pm 0,04)
50	4,6 (\pm 0,1)	1,9 (\pm 0,5)	6,1 (\pm 1,0)	2,5 (\pm 1,1)	-	0	8,3 (\pm 0,1)	8,9 (\pm 0,03)
60	4,5 (\pm 0,1)	0,9 (\pm 0,4)	5,0 (\pm 0,9)	2,2 (\pm 0,7)	-	-	7,7 (\pm 0,2)	8,8 (\pm 0,04)
70	4,4 (\pm 0,1)	0	4,4 (\pm 0,9)	0	-	-	7,2 (\pm 0,08)	7,6 (\pm 0,1)
80	4,3 (\pm 0,1)	-	3,4 (\pm 0,7)	-	-	-	6,2 (\pm 0,1)	7,3 (\pm 0,09)
90	4,1 (\pm 0,07)	-	2,8 (\pm 0,7)	-	-	-	5,5 (\pm 0,1)	6,5 (\pm 0,3)
100	3,9 (\pm 0,03)	-	2,3 (\pm 0,6)	-	-	-	4,6 (\pm 0,1)	5,8 (\pm 0,2)
110	3,9 (\pm 0,08)	-	1,8 (\pm 0,5)	-	-	-	4,1 (\pm 0,2)	5,5 (\pm 0,1)
120	3,9 (\pm 0,03)	-	1,5 (\pm 0,4)	-	-	-	3,9 (\pm 0,1)	5,2 (\pm 0,07)

ANEXO B – média da resistência periférica cardíaca.

Tabela 10: Média com erro padrão da resistência periférica cardíaca dos grupos “Aberto”, “Fechado”, “Atropina”, “Fisostigmina” e “Carbacol” durante todos os experimentos.

TEMPO (min)	C. Aberto	Fechado 100 ml	Atropina	Fisostigmina	Carbacol
10	4,4 (±0,27)	3,5 (±0,95)	2,2 (±0,27)	2,8 (±0,60)	4,4 (±0,13)
20	4,1(±0,40)	3,3 (±0,76)	2,4 (±0,30)	1,6 (±0,35)	4,0 (±0,21)
30	4,6 (±0,33)	3,5 (±0,87)	2,8 (±0,40)	1,7 (±0,77)	4,0 (±0,16)
40	4,1(±0,44)	3,9 (±1,04)	2,8 (±0,41)	3,1 (±1,82)	0
50	5,0 (±0,70)	4,7 (±1,30)	2,6 (±0,49)	2,0 (±0,85)	-
60	4,9 (±0,43)	3,5 (±0,36)	2,8 (±0,57)	1,5 (±0,88)	-
70	4,7 (±0,68)	0	2,9 (±0,57)	-	-
80	4,8 (±0,94)	-	3,6 (±0,79)	-	-
90	4,4 (±0,83)	-	3,8 (±0,82)	-	-
100	4,6 (±0,62)	-	4,6 (±0,98)	-	-
110	4,4 (±0,75)	-	4,1 (±0,79)	-	-
120	4,3 (±0,73)	-	3,8 (±0,83)	-	-
Média	4,5 (±0,59)	3,7 (±0,88)	3,2 (±0,60)	2,1 (±0,83)	4,1 (±0,17)

Tabela 11: Média com erro padrão da resistência periférica cardíaca dos grupos “Propranolol”, “Isoproterenol”, “Isoproterenol e Atropina”, “DMPP” e “DMPP e Atropinal” durante todos os experimentos.

TEMPO (min)	Propranolol 1µM	Isoproterenol	Isoproterenol e Atropina 1µM	Dmpp 1µM	Dmpp e Atropina 1µM
10	3,6 (±0,22)	2,9 (±0,27)	3,0 (±0,06)	3,4 (±0,77)	3,2 (±0,20)
20	1,6 (±0,22)	3,6 (±0,12)	3,6 (±0,10)	4,5 (±0,74)	4,2 (±0,18)
30	1,7 (±0,33)	3,8 (±0,14)	3,9 (±0,02)	3,9 (±0,47)	4,0 (±0,18)
40	2,4 (±0,49)	3,8 (±0,13)	3,9 (±0,02)	3,7 (±0,31)	4,0 (±0,19)
50	0	3,7 (±0,08)	3,7 (±0,03)	3,6 (±0,52)	3,9 (±0,20)
60	-	3,1 (±0,25)	3,4 (±0,07)	4,1 (±1,28)	3,6 (±0,21)
70	-	2,7 (±0,19)	3,1 (±0,02)	3,9 (±1,38)	3,9 (±0,21)
80	-	2,5 (±0,08)	2,7 (±0,19)	3,7 (±1,23)	4,2 (±0,23)
90	-	2,3 (±0,21)	2,2 (±0,03)	3,4 (±1,01)	4,1 (±0,26)
100	-	2,1 (±0,11)	2,1 (±0,04)	2,0 (±0,57)	5,2 (±0,29)
110	-	2,1 (±0,26)	2,1 (±0,02)	2,0 (±0,51)	4,1 (±0,12)
120	-	1,8 (±0,21)	3,2 (±0,02)	1,7 (±0,47)	3,5 (±1,65)
Média	2,3 (±0,32)	2,9 (±0,17)	3,0 (±0,05)	3,3 (±0,77)	4,0 (±0,33)

OBSERVAÇÃO:

A resistência periférica média de todos os corações estudados é (mmHg x min/ml): $3,31 \pm 0,47$.

ANEXO C – artigo publicado no IV Congresso Latino Americano de Engenharia Biomédica (arquivo PDF).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)