

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE-5 SOBRE AS PROPRIEDADES
DE TRANSDUÇÃO DINÂMICA DO NERVO VAGO CARDÍACO EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

PATRÍCIA BORGES PEIXOTO

UBERABA/MG, 2006

PATRÍCIA BORGES PEIXOTO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE-5 SOBRE AS PROPRIEDADES
DE TRANSDUÇÃO DINÂMICA DO NERVO VAGO CARDÍACO EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Agosto, 2006

PATRÍCIA BORGES PEIXOTO

Dissertação intitulada “*Efeito da Inibição da Fosfodiesterase-5 sobre as Propriedades de Transdução Dinâmica do Nervo Vago Cardíaco em Ratos Espontaneamente Hipertensos*”, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Uberaba, de agosto de 2006.

1. DEDICATÓRIAS

A Deus, por existir e me iluminar em minha caminhada diária;

À Zuleika, minha mãe e amiga, pela dedicação e força em todos os momentos de minha vida;

Aos meus irmãos Alberto e Cícero Neto, pelo prazer e orgulho de tê-los como irmãos;

Aos meus avós, Cícero e Maria de Lourdes, pelos momentos de alegria e força em meus estudos;

Aos meus tios, tias e primos, pela atenção, carinho e união.

Ao meu namorado Ideon, pelo carinho, amor, compreensão e companheirismo.

2. AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de Mestrado envolveu várias pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho. Agradeço a todas elas pela compreensão nestes dois anos de jornada.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva, pela pessoa maravilhosa que é, por me orientar neste trabalho e me incentivar a novas descobertas;

Aos professores da disciplina de Fisiologia, Dr. Luis Carlos dos Reis e Dr. Edson de Sousa Marquês, pelos valiosos ensinamentos, convívio agradável e exemplo de profissionalismo;

Ao Octávio, pela dedicação e auxílio na concretização deste projeto;

Aos meus amigos Octávio, Vanessa, Marília, Karime, Elizabeth, Maria de Lourdes, Marcos Paulo, Alethéia e Thiago, pela convivência no laboratório de Fisiologia;

Aos técnicos de laboratório da disciplina de Fisiologia, Ana Maria, Margareth, Donizete e Glauco, pela atenção, apoio e cuidado com os animais no biotério;

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional;

Às enfermeiras Dirce e Joana, pela compreensão, apoio, incentivo e pela cobertura de minhas ausências;

Às minhas amigas Patrícia, Pollyana e Tamiê, pelo companheirismo, carinho e apoio durante esta trajetória;

Aos amigos e familiares não citados que entenderam minha escolha e torceram por mim durante esta trajetória.

RESUMO

Recentes estudos relatam que o citrato de sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE-5), amplamente usado no tratamento da disfunção erétil, provoca vasodilatação e ativação simpática reflexa, os quais podem elevar o risco cardiovascular. Entretanto, seus efeitos no controle parassimpático vagal cardíaco, no contexto da hipertensão arterial não estão muito bem elucidados. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre as propriedades de transdução dinâmica do nervo vago cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY). Para tal, trinta e nove ratos SHR e WKY machos com idade em torno de 20 semanas foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo WKY controle (n=9); grupo WKY tratado (n=10); grupo SHR controle (n=10) e grupo SHR tratado (n=10). Após serem anestesiados, todos os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria carótida esquerda (para registro direto da pressão arterial) e isolamento do nervo vago cervical direito (para estimulação elétrica). Após registro basal por 5 minutos e administração de propranolol (4 mg/Kg, i.v.), seguido de mais 5 minutos de registro direto da pressão arterial, os animais tratados receberam citrato de sildenafil (1mg/Kg, i.v.) e os animais controle receberam salina (1 mL/Kg). O protocolo de estimulação dinâmica do nervo vago, na faixa de frequência de 0,1 - 2,0Hz, foi realizado e analisado por meio de análise função de transferência, o qual permitiu estimar a coerência, desvio de fase e magnitude da função de transferência nas faixas de baixa (*low frequency*-LF=0,1-0,8Hz) e alta frequência (*high frequency*-HF=1,0-2,0Hz). O tratamento com sildenafil provocou significativa hipotensão arterial em ambos os animais normotensos e hipertensos, sendo a magnitude da mesma mais intensa nos animais hipertensos. Nestes animais, a marcada hipotensão foi acompanhada de uma discreta resposta taquicárdica, a

qual não se manifestou nos animais normotensos. Em relação ao protocolo de estimulação elétrica dinâmica do nervo vago cardíaco, embora a magnitude da resposta à estimulação vagal dos animais SHR salina apresentasse valores significativamente maiores ($20,9 \pm 4,06$ ms/Hz na faixa LF e $11,1 \pm 2,4$ ms/Hz na faixa HF), em comparação aos ratos WKY salina ($12,1 \pm 4,3$ ms/Hz em LF e $3,9 \pm 2,5$ ms/Hz em HF, $p < 0,05$), o tratamento com citrato de sildenafil não modificou os valores de magnitude da função de transferência, bem como coerência e desvio de fase em ambos os grupos de animais SHR ou WKY. Estes dados indicam que o tratamento com citrato de sildenafil, seja em ratos normotensos, seja em ratos hipertensos, não modifica as propriedades de transdução dinâmica no nervo vago cardíaco periférico, sugerindo que a fosfodiesterase-5 não desempenha um papel significativo na modulação dinâmica da função vagal cardíaca periférica em ratos.

ABSTRACT

Recent data have reported that sildenafil citrate, an inhibitor of phosphodiesterase-5 (PDE-5), widely used in the treatment of erectile dysfunction, causes vasodilation and reflex sympathetic activation, which may enhance cardiovascular risk. However, the effects of sildenafil citrate on cardiac vagal parasympathetic control, in the arterial hypertension context, have not been yet elucidated. The aim of the present study was to evaluate the effects of the acute treatment with sildenafil citrate on the dynamic transduction properties of the cardiac vagus nerve in spontaneously hypertensive rats (SHR) comparing with their normotensive controls, the Wistar-Kyoto (WKY) rats. Thirty nine male 20-weeks old rats were divided in four experimental groups: group WKY control (n=9); group WKY treated (n=10); group SHR control (n=10) and group SHR treated (n=10). All animals, after anesthesia with sodium pentobarbital (40 mg/Kg, i.p.), were submitted to surgical procedure in order to implant canula into the left common carotid artery (for arterial blood pressure recordings) and isolation of right cervical vagus nerve (for electrical stimulation). After baseline recording during five minutes followed by propranolol administration (4 mg/Kg, i.v.) and another 5 minutes arterial pressure recording period, the animals, according to their groups, received sildenafil citrate (1mg/Kg, i.v.) or saline (1 mL/Kg). The dynamic stimulation of vagus nerve, in the frequency ranges from 0,1 to 2,0Hz, was performed and analyzed by means of transfer function analysis, which permit to calculate in the frequency domain the coherence, the phase shift and the magnitude of the transfer function between nervous stimulus (input signal) and pulse interval response (output signal) in the low (LF=0,1-0,8Hz) and high frequency ranges (HF=1,0-2,0Hz). The acute treatment with sildenafil citrate caused a significant arterial hypotension in both normotensive and hypertensive animals, being

more intensive in hypertensive animals. In these animals, the marked arterial hypotension was associated to a light tachycardic response, which was not observed in normotensive rats. Regarding to dynamic electrical stimulation of the cardiac vagus nerve, although the transfer function magnitude (dynamic gain) in control SHR_s was higher ($20,9 \pm 4,06 \text{ms/Hz}$ in LF range and $11,1 \pm 2,4 \text{ms/Hz}$ in HF range) than that observed in control WKY rats ($12,1 \pm 4,3 \text{ms/Hz}$ in LF range and $3,9 \pm 2,5 \text{ms/Hz}$ in HF range, $p < 0,05$), the treatment with sildenafil citrate was not able to change the values of transfer function magnitude, as well as coherence and phase shift in both SHR and WKY rats. These data indicate that acute sildenafil citrate, in both normotensive and hypertensive rats, does not modify the dynamic transduction properties of the peripheral cardiac vagus nerve, suggesting that phosphodiesterase-5 does not play a significant role in the dynamic modulation of the peripheral cardiac vagal parasympathetic function in rats.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
SUMÁRIO	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	24
2.1- Objetivos Gerais	24
2.2- Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1- Seleções dos Animais	25
3.2- Grupos Experimentais	25
3.3- Procedimentos Cirúrgicos Gerais	26
3.4- Isolamento do Nervo Vago Cervical Direito	26
3.5- Protocolo Experimental	27
3.6- Análise dos Dados	29
3.7- Análise Estatística	31
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	53
7. BIBLIOGRAFIA	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AV	atrioventricular
bpm	Batimento por Minuto
°C	Grau Celcius
Ca	Cálcio
DE	Disfunção Erétil
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Frequência Cardíaca
g	Gramas
GMPc	Guanosina Mono-Fostato Cíclico
h	Hora
Ica	Íon cálcio
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IP	Intervalo de Pulso
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Kg	Kilograma
LF	Componente de Baixa Frequência
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de Mercúrio
NC	Normotenso Controle
NO	Óxido Nítrico
NOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase
NT	Normotenso Tratado
P	Probabilidade
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PDE-5	Fosfodiesterase-5
PE-50	Cateter de Polietileno
PKC	Proteína Quinase C
RPT	Resistência Periférica Total
SA	Sinoatrial
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats – Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
vs	Versus
WKY	Wistar-Kyoto – Ratos Normotensos

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Registro simultâneo da pressão arterial e do estímulo elétrico a 0,4 Hz em um rato WKY anestesiado	28
FIGURA 2	Painel superior: Séries temporais do intervalo de pulso e da frequência de estimulação (0,4 Hz) de um rato WKY anestesiado. Painel inferior: Gráficos de coerência, desvio de fase e magnitude da função de transferência obtidos pela aplicação da análise espectral cruzada nas duas séries temporais mostradas no painel superior. Setas verticais indicam os valores coletados na frequência de estimulação de 0,4 Hz ..	30
FIGURA 3	Valores médios (\pm EPM) da pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos tratado com sildenafil ou salina (* $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina)	34
FIGURA 4	Valores médios (\pm EPM) da frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos tratado com citrato de sildenafil ou salina (* $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop))	35
FIGURA 5	Valores médios (\pm EPM) da PAM em ratos hipertensos tratados com citrato de sildenafil ou salina * $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina)	36
FIGURA 6	Valores médios (\pm EPM) da frequência cardíaca em ratos hipertensos tratados com citrato de sildenafil ou salina (* $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina)	37
FIGURA 7	Valores médios (\pm EPM) da coerência entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas nos ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e sildenafil	39
FIGURA 8	Valores médios (\pm EPM) do desvio de fase entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas em ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e sildenafil	40
FIGURA 9	Valores médios (\pm EPM) magnitude da função de transferência entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas em ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e citrato de sildenafil (* $P < 0,05$ para o efeito hipertensão x normotensão)	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores médios (\pm EPM) dos parâmetros de magnitude da função de transferência, desvio de fase e coerência entre a frequência do estímulo elétrico vagal e o intervalo de pulso de ratos WKY ou SHR, tratados com salina ou sildenafil calculados como médias nas faixas de baixa (0,2-0,8Hz, LF) e alta frequências (1,0-2,0Hz)	42
-----------------	--	----

1. INTRODUÇÃO

Considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo ocidental, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 1996). Sendo uma síndrome clínica freqüentemente observada na população adulta, sua prevalência está estimada em 15-20%. Cerca de 11% a 20% desta população adulta nos países desenvolvidos, com idade superior a 20 anos, são portadores de HAS, mas somente 50% desses pacientes sabem de sua doença (SANTELLO et al., 1996). Estudos realizados nos Estados Unidos revelam que 25% de sua população é hipertensa e, ao que parece, o Brasil está caminhando para estatísticas semelhantes. A estimativa mundial de que 50% das mortes na população, com idade acima de 50 anos, deve-se à doenças do aparelho cardiovascular é também aplicável ao Brasil. E, isoladamente, a HAS incide como um dos mais importantes fatores de risco em 80% dos casos de insuficiência cardíaca, insuficiência coronária, acidente vascular cerebral e insuficiência vascular periférica. (MION JR. et al., 1994).

Apesar de importantes avanços no entendimento de vários aspectos de sua fisiopatologia e da existência de diversas modalidades terapêuticas altamente efetivas, o número de pacientes hipertensos ainda sem diagnóstico ou com tratamento ineficaz é alarmante (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 1996). Além do mais, ainda falta muito por ser investigado para que se conheça bem a patogênese da hipertensão arterial, reconhecidamente de origem multifatorial.

Um enorme arsenal terapêutico dotado de grande eficácia no tratamento desta síndrome e de suas conseqüências está atualmente disponível com grande impacto positivo na qualidade de vida e, conseqüentemente, na redução da mortalidade de indivíduos hipertensos (GANTEN & JONG, 1994). Além de intervenções farmacológicas, medidas

higieno-dietéticas e comportamentais também fazem parte do arsenal terapêutico disponível. Como exemplos, podem-se incluir nesta categoria a redução da ingestão de sal, redução do tabagismo e alcoolismo, controle da obesidade, redução do *stress* diário, prática regular de exercícios físicos, dentre outros. (GANTEN & JONG, 1994)

Modelos experimentais envolvendo doenças que afetam o funcionamento normal do sistema cardio-circulatório são comumente utilizados em estudos da fisiologia cardiovascular e têm contribuído em muito para o entendimento dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial (PA) e também no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o controle dos níveis tensionais elevados (FAZAN JR. et al., 2001). Perturbações da normalidade podem servir como instrumento de avaliação da fisiologia normal.

Vários modelos experimentais envolvendo alterações do sistema cardiovascular são amplamente estudados, entre eles: modelos de hipertensão arterial, modelos de isquemia e/ou infarto do miocárdio, modelos de insuficiência cardíaca, entre outros. Neste contexto, um modelo em especial merece destaque: o modelo de hipertensão espontânea em ratos (ratos espontaneamente hipertensos – SHR).

Desenvolvido originalmente em 1963 em Kyoto no Japão, a partir de endocruzamentos seletivos de ratos da cepa Wistar (OKAMOTO, 1966; OKAMOTO & AOKI, 1963) este modelo é, talvez, o mais utilizado e estudado na literatura. Sua importância tem sido creditada à similaridade da sua patogenia com a HAS essencial humana, embora algumas ressalvas devam ser feitas, tais como: 1) o reconhecimento da improbabilidade de que tais formas de hipertensão espontânea tanto no rato como no homem, sejam a expressão de uma mesma doença hipertensiva determinada geneticamente; 2) ambas têm origem poligênica e são influenciadas por diversos fatores ambientais; 3) sendo o controle

cardio-circulatório multifatorial, certos mecanismos pressores não se expressam, necessariamente, em ambas as situações. (TRIPPODO & FROHLICH, 1981)

Os SHR iniciam o desenvolvimento de HAS com aproximadamente 04 semanas de idade, apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos já entre a 7^a e a 15^a semanas, atingindo um platô entre a 20^a e a 28^a semanas. A partir desta idade, a hipertensão se estabiliza aproximadamente até 1 a 1,5 anos de idade, quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, associada à uma elevada taxa de mortalidade. Fatores ambientais tais como ingestão exagerada de sódio, estresse, alterações sociais, alterações no ciclo claro-escuro, etc., afetam o desenvolvimento da hipertensão. (YAMORI, 1994)

Os mecanismos associados aos níveis tensionais elevados são decorrentes de uma considerável elevação na resistência periférica total (RPT), acompanhados de um débito cardíaco normal ou até mesmo reduzido. Uma das principais responsáveis pela elevação da resistência periférica total é a marcada hiperatividade simpática (IRIGOYEN et al., 2000; JUDY et al., 1976), que se constitui em uma das características mais importantes dos SHR (FAZAN JR. et al., 2001; JUDY et al., 1976)

O controle neural cardiovascular exercido, fundamentalmente, pelo sistema nervoso autônomo (SNA), encontra-se profundamente alterado na HAS e está associado à gênese dos níveis tensionais elevados, bem como de inúmeros distúrbios associados à hipertensão, tais como, hipertrofia, insuficiência e arritmias cardíacas, morte súbita, etc. (FAZAN JR. et al., 2001; IRIGOYEN et al., 2000)

Tem sido demonstrado que a hiperatividade nervosa simpática cardíaca está presente nos SHR jovens (FAZAN JR. et al., 2001; ADAMS et al. 1989; McCARTY et al., 1987; TUCKER & JOHNSON, 1984), e que essa hiperatividade pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da HAS e da hipertrofia cardíaca (FAZAN JR. et al.,

2001; HEAD & McCARTY, 1987; HOCKEL, 1976). Uma vez que a hipertrofia cardíaca associada à hipertensão arterial modifica marcadamente o fenótipo cardíaco (SWYNGHEDAUW & BAILLARD, 2000) é possível que as respostas cardíacas à estimulação simpática estejam modificadas, se comparadas aos animais normotensos controles, obviamente sem hipertrofia. Entretanto, poucos são os estudos encontrados na literatura relativos a esse assunto.

Em SHR jovens, anestesiados e artificialmente ventilados, a estimulação do nervo simpático cardíaco provocou uma resposta taquicárdica semelhante à de ratos WKY de mesma idade (MASUDA, 2000). Não foram encontrados estudos em ratos SHR adultos com hipertensão já estabelecida. Em um estudo de estimulação central de neurônios controladores do simpático vasomotor, localizados na região rostral ventral lateral do bulbo, Kuo & Yang (2000) demonstraram por meio de análise espectral cruzada, uma resposta vasomotora periférica aumentada à estimulação dinâmica, dentro das faixas de frequências fisiologicamente relevantes.

Por outro lado, a inervação vagal cardíaca em SHR, especialmente no nodo sinusal, não tem sido completamente explorada. Estudos anteriores usando o bloqueio vagal com a metilatropina demonstram que os aumentos na frequência cardíaca (FC) foram maiores em SHR que em ratos WKY de mesma faixa etária (TUCKER & DOMINO, 1988; OKAMOTO, 1966). Além do mais, o componente vagal da regulação barorreflexa da FC foi incrementado em SHR jovens quando comparado aos WKY de mesma idade, ou seja, 6 semanas, conforme Head & Adams (1988), na qual as aferências barorreceptoras não são diferentes entre as duas cepas (ANDRESEN & BROWN, 1980). Estas observações sugerem que o controle vagal da FC pode estar aumentado em SHR jovens.

Estes resultados obtidos em SHR jovens contrastam com os poucos estudos de função vagal realizados em SHR adultos, onde o componente vagal do controle barorreflexo

da frequência está marcadamente diminuído (MINAMI & HEAD, 2000), sugerindo que existem mudanças na resposta vagal cardíaca durante o desenvolvimento da hipertensão neste modelo. Estudos de Ferrari et al. (1992) e Ferrari et al. (1991), usando estimulação vagal direita em uma faixa limitada de idade (8–12 semanas), encontraram uma bradicardia similar aos normotensos em ratos SHR de 8 semanas mas, significativamente maior, nos SHRs de 12 semanas, sugerindo que a idade pode estar relacionada com as alterações na atividade parassimpática.

Um estudo similar realizado por Minami & Head (2000) foi incapaz de demonstrar diferenças significativas nas respostas bradicárdicas à estimulação vagal cardíaca entre ratos SHR e WKY adultos. Estes autores sugeriram que o déficit barorreflexo cardíaco observado em animais SHR provavelmente não é dependente de uma disfunção vagal periférica.

Uma análise global dos trabalhos acima descritos permite concluir que em SHR, os efeitos cardíacos da estimulação do nervo vago dirigido para o coração não estão muito bem esclarecidos. Em parte esta dificuldade pode residir no modo de estimulação dos nervos autonômicos, onde faixas de frequências contínuas variando de 1 a 64 Hz foram empregadas, as quais não são fisiológicas. A análise da ritmicidade do nervo autonômico, tanto simpático como parassimpático, tem demonstrado que os disparos dos mesmos não são contínuos de tempo e, sim, agrupados em trens de potenciais de ação. As frequências de ocorrência desses trens variam fisiologicamente entre 0.01 a 10 Hz em ratos. (MALPAS, 2002)

Estudos recentes sugerem que o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) endógeno apresenta um importante papel no controle do sistema autonômico cardiovascular. O NO é sintetizado através da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* - NOS), a qual tem três isoformas: a NOS endotelial (NOS3) encontrada no endotélio

vascular, nas plaquetas, miocárdio e endocárdio; a NOS neuronal (NOS1) expressa nos tecidos do sistema nervoso e a NOS induzida (NOS2) expressa nos macrófagos e outras células do sistema imunológico, após estimulação imune. (MARLETTA, 1993)

Estudos experimentais sugerem que o NO atua como um neuromodulador não somente dentro do sistema nervoso central (SNC), mas também dentro de vias autonômicas periféricas, controlando a função cardíaca ao provocar um aumento efetivo no controle parassimpático e uma inibição do controle simpático da frequência cardíaca (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999). Segundo Tagawa et al. (1994), o NO tem mostrado aumentar a atividade neuronal dentro do núcleo do trato solitário (NTS) bulbar (o sítio de projeção primário das fibras aferentes barorreceptoras), bem como aumentar a atividade de motoneurônios vagais bulbares no núcleo motor dorsal do vago (sítio de origem de um importante contingente de fibras parassimpáticas vagais cardíacas pré-ganglionares), de acordo com Travagli et al. (1994).

Dados morfológicos evidenciaram que até 40% dos nervos cardíacos periféricos intrínsecos expressam NOS neuronal (nNOS) (ARMOUR et al., 1995), incluindo as terminações nervosas que inervam as regiões dos nós sino-atriais (nó SA) e atrioventricular (nó AV) (KLIMASCHEWSKI et al., 1992). A NOS endotelial, por sua vez, tem sido identificada dentro de cardiomiócitos do nó SA e em capilares adjacentes (HAN et al., 1998). O NO gerado nestes sítios autonômicos cardíacos periféricos parecem aumentar não somente a resposta de frequência cardíaca à estimulação nervosa parassimpática vagal (CHOATE et al., 2001; HERRING & PATERSON, 2001; CONLON & KIDD, 1999; ELVAN et al., 1997), mas também parecem aumentar o antagonismo parassimpático das respostas simpáticas cardíacas (atividade simpato-inibitória indireta) (SEARS et al., 1998; ELVAN et al., 1997). Além do mais, o NO parece inibir diretamente as respostas cardíacas à estimulação simpática em animais. (BALLIGAND, 1999)

Estudos *in vitro* têm ainda mostrado que o NO pode também ter efeitos diretos não-neuralmente mediados sobre o nó SA, aumentando a FC via estimulação de correntes de marcapasso I_f (MUSIALEK et al., 1997). Entretanto, este efeito direto observado *in vitro* parece ser menos importante, uma vez que o mesmo não tem sido descrito na maioria dos estudos realizados *in vivo* com a inervação autonômica intacta. Assim, qualquer efeito direto do NO sobre o nó SA é sobrepujado pelos efeitos opostos do NO sobre o controle autonômico cardíaco. (CHOWDHARY et al., 2004)

Os efeitos diretos do NO sobre neurônios vagais cardíacos ou sobre cardiomiócitos são mediados pelo nucleotídeo GMPc (Guanosina Mono-Fostato Cíclico), sintetizada pela Guanilato Ciclase após ser ativada por nitrosilação mediada pelo NO. Os efeitos neuronais e cardíacos do GMPc não são ainda muito bem conhecidos e recentemente foram alvos de intenso estudo. Estimulação de receptores muscarínicos ativa NOS endothelial ligada à cavéolas em cardiomiócitos (FERON et al., 1998). A geração de NO resultante provoca uma inibição GMPc-dependente da corrente de entrada lenta de cálcio (I_{Ca-L}), a qual pode mediar pelo menos parcialmente a resposta bradicárdica muscarínica. Nenhum efeito do NO sobre correntes de saída de potássio operadas pela acetilcolina (via muscarínica direta) foi evidenciado até o momento (HAN et al., 1998).

Por outro lado, doadores de NO ou mais especificamente, a transfecção gênica adenoviral de NOS neuronal em átrio direito de cobaia foi capaz de aumentar a liberação GMPc-mediada de acetilcolina de terminações vagais em resposta à estimulação elétrica, sugerindo um eventual efeito pré-sináptico da via NO-GMPc sobre a liberação neural de acetilcolina no coração. (MOHAN et al., 2002; HERING & PATERSON, 2001)

Todos os achados descritos acima parecem evidenciar que um aumento da via da L-Arginina-NO-GMPc no coração poderia levar a um aumento na modulação parassimpática associada com redução concomitante na modulação simpática cardíaca, o que poderia ser

de grande benefício na redução de risco cardiovascular de arritmias cardíacas graves e de morte súbita no contexto de inúmeras doenças cardiovasculares que cursam com redução da atividade vagal e aumento da atividade simpática cardíaca, como a doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial sistêmica. Várias estratégias de melhoria desta via têm sido estudadas, por exemplo, através de fármacos que provocam uma acentuação da produção do NO, através da suplementação com L-arginina, regulação da produção da NOS endotelial, administração de estrógenos, de vitamina C e de inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE 5) como o sildenafil, que aumenta a biodisponibilidade do GMPc. (CORBIN & FRANCIS, 1999)

Considerado um inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE-5), o sildenafil faz parte de uma classe de agentes vasodilatadores desenvolvidos para o tratamento da disfunção erétil, além de possuir efeitos cardiovasculares importantes, pois age competindo com a PDE-5, levando assim a uma redução da degradação do GMPc, ocorrendo o aumento desse nos tecidos, resultando em vasodilatação e, conseqüentemente, melhora da disfunção erétil. A enzima fosfodiesterase-5, responsável pela degradação do GMPc, pode ser encontrada nos corpos cavernosos, na parede das artérias pulmonares e coronárias, na parede das veias sistêmicas, nos músculos esqueléticos, vísceras e músculos traqueobrônquicos, cérebros, retina e plaquetas (RAJA & NAYAK, 2004). Expressão de fosfodiesterase 5 também tem sido descrita no músculo cardíaco, embora não especificamente sobre neurônios intrínsecos do coração. (DAS et al., 2005)

O sildenafil possui efeitos cardiovasculares sobre a frequência cardíaca, pressão arterial, na circulação pulmonar e coronária, no endotélio, na repolarização cardíaca e sobre a falência crônica cardíaca (RAJA & NAYAK, 2004). Mais recentemente, um efeito cardioprotetor dos inibidores da fosfodiesterase-5 está sendo descrito no contexto da isquemia cardíaca, através da diminuição da área infartada, melhora da função ventricular

esquerda, diminuição da incidência de fibrilação ventricular e diminuição da necrose miocárdica. (KUKREJA et al., 2003). O NO pode ser identificado como um mediador essencial nesta ação cardioprotetora.

Num evento isquêmico agudo, grande liberação endógena de mediadores como a adenosina e a bradicinina pode ser verificada. Estes mediadores, por sua vez, podem desencadear uma cascata de eventos através da ação de proteínas quinases, resultando na fosforilação das enzimas NO sintases e formação de óxido nítrico o qual, por sua vez, através da estimulação da guanilato-ciclase, induz a um aumento no conteúdo de GMPc intra-celular que ativa a proteína quinase G (PKG). Entre os vários efeitos da PKG, pode ser descrita a ação fosforilante sobre canais de potássio ATP sensíveis mitocondriais, os quais tornam-se mais permeáveis, aumentando a capacidade das mitocôndrias em suportar um ambiente hipóxico. Uma vez que as mitocôndrias são responsáveis pela síntese de ATP e manutenção da homeostase de Ca, com a abertura desses canais ocorre uma compensação do potencial da membrana mitocondrial, contribuindo para a cardioproteção. O sildenafil e outros inibidores da PDE5 podem potencializar os efeitos do GMPc, desencadeando esta cascata de eventos nos miócitos cardíacos. (DAS et al., 2005; KUKREJA et al., 2003)

Os efeitos do sildenafil devido ao aumento de GMPc na musculatura vascular, possuem propriedades vasodilatadoras, resultando em hipotensão, alterando tanto a PA sistólica quanto a PA diastólica, além da diminuição da pressão arterial pulmonar, da resistência vascular pulmonar e da resistência vascular periférica e sistêmica. (BRINDIS & KLONER, 2003)

O efeito vasodilatador do sildenafil é potencializado se associado aos nitratos orgânicos ou às drogas doadoras de NO, pois os mesmos agem na via NO-GMPc, resultando no acúmulo de GMPc, podendo desencadear uma hipotensão fatal (BRINDIS & KLONER, 2003). Portanto, esta associação pode aumentar o risco cardiovascular, além de

ser de grande risco quando se associa o sildenafil a eventos isquêmicos como no início da terapia ou ao uso desta droga durante um longo período. (RAJA & NAYAK, 2004)

A hipoperfusão miocárdica induzida pelo exercício físico ou presença de estenose da artéria coronária é melhorada com o uso do sildenafil, através do aumento do fluxo coronariano. Este aumento do fluxo coronariano em repouso e durante exercícios físicos, sugere modesta ação vasodilatadora na resistência dos vasos coronários. (RAJA & NAYAK, 2004)

O sildenafil pode ser utilizado para reverter a disfunção endotelial (GROSS, 2005). A DE é uma resposta anormal que leva à uma menor biodisponibilidade de NO e debilita a vasodilatação levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de aterosclerose e síndromes coronarianas agudas. A diminuição do NO pode afetar a agregação das plaquetas, a inflamação da parede vascular e proliferação das células musculares lisas. Esta droga tem demonstrado melhora do efeito vasomotor da disfunção endotelial em pacientes com falência cardíaca e pacientes com diabetes tipo 2, além de melhorar a agregação plaquetária e aumentar a proliferação de células musculares lisas. Esta melhora na DE, provoca melhora na tolerância aos exercícios físicos em pacientes com falência cardíaca. (GROSS, 2005)

Como pode ser atestado acima, inúmeros efeitos cardiovasculares têm sido descritos para o sildenafil. Entretanto, na literatura nada foi encontrado sobre um eventual efeito do sildenafil sobre a resposta cardíaca à estimulação parassimpática vagal, seja em condições normais ou em situações patológicas. Como a via da L-arginina-NO-GMPc parece modular esta resposta parassimpática vagal cardíaca e como o sildenafil potencia o GMPc, seria o sildenafil capaz de aumentar a ação vagal parassimpática sobre o coração? Em sendo positiva a resposta para a pergunta acima, seria este efeito um dos responsáveis pela cardioproteção induzida pelo sildenafil recentemente descrita?

No presente estudo, as alterações hemodinâmicas e autonômicas, bem como as respostas cardíacas à estimulação dinâmica cardíaca do nervo vago em faixas de frequências fisiologicamente relevantes foram avaliadas em ratos hipertensos SHR, os quais reconhecidamente evidenciam uma disfunção vagal cardíaca e, em ratos WKY controles normotensos, os quais foram tratados com uma administração aguda de citrato de sildenafil.

Para proceder à avaliação das respostas à estimulação do nervo vago cardíaco, utilizou-se neste trabalho, a metodologia de análise espectral cruzada usando a frequência dos trens de estímulos como sinal de entrada e a resposta da FC como sinal de saída. Nas faixas de frequência de estimulação que apresentaram coerência maior que 50%, a magnitude da função de transferência entre a entrada e a saída, foi usada como índice de efetividade da ação nervosa sobre o nó sinusal.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre as propriedades de transdução dinâmica do nervo vago cardíaco em ratos SHR e em ratos WKY normotensos controle adultos.

2.2- Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basais em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em seus controles normotensos (WKY)

2.2.2 Avaliar os efeitos do tratamento agudo com citrato de sildenafil sobre a coerência, o desvio de fase e a magnitude da função de transferência entre a estimulação vagal parassimpática (sinal de entrada) e a resposta da frequência cardíaca (sinal de saída) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e em seus controles normotensos (WKY).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção dos Animais

Foram utilizados ratos normotensos (Wistar-Kyoto-WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*-SHR), machos, com idade inicial de \pm 20 semanas, fornecidos pelo biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais foram mantidos em condições estáveis em biotério, onde tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais empregados neste projeto estão de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *The US National Institutes of Health (NIH) publication n. 85-23, revised 1996*).

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento recebido:

- a. Grupo normotenso controle (NC), composto por animais WKY que receberam solução salina (n=9);
- b. Grupo normotenso tratado (NT), composto por animais WKY que receberam citrato de sildenafil (1 mg/kg, i.v.) (n=10);
- c. Grupo hipertenso controle (HC), composto por animais hipertensos (SHR) que receberam solução salina (n=10);

- d. Grupo hipertenso treinado (HT) composto por animais hipertensos (SHR) que receberam citrato de sildenafil (1 mg/kg, i.v.) (n=10).

3.3. Procedimentos cirúrgicos gerais

Os animais dos grupos acima citados foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.). Após uma cervicotomia mediana, a traquéia foi isolada e uma traqueostomia foi realizada para facilitar a ventilação espontânea dos animais. A artéria carótida comum esquerda foi isolada e um cateter de polietileno (PE-50) foi introduzido para permitir uma posterior medida direta da pressão arterial. A veia jugular esquerda também foi canulada para administração dos fármacos. Durante todo o período experimental, a temperatura corporal do animal foi mantida em aproximadamente 37°C através do uso de uma mesa cirúrgica aquecida. A seguir, foi realizado o isolamento do nervo vago cervical do lado direito, de acordo com a descrição abaixo.

3.4. Isolamento do Nervo Vago Cervical Direito

O nervo vago direito que contém fibras parassimpáticas dirigidas para o coração, foi delicadamente dissecado e isolado na região do feixe vaso-nervoso cervical direito. Após o isolamento, a extremidade cranial do mesmo foi isolada imediatamente abaixo do gânglio nodoso e o nervo foi posicionado sobre um par de eletrodos de aço inoxidável conectado a um estimulador elétrico. Para prevenir o ressecamento da preparação e prover um isolamento elétrico, o eletrodo de estimulação e o nervo vago direito foram imersos em óleo mineral. Uma dose de propranolol de 5 mg/kg, i.v. foi administrada após 5 minutos de

um registro basal para se eliminar uma possível interação entre o simpático cardíaco e nervo parassimpático vagal cardíaco.

3.5. Protocolo Experimental

Uma vez terminados os procedimentos cirúrgicos acima descritos, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão arterial e a um amplificador de sinais (*Model 8805A*, Hewlett-Packard, USA) e o par de eletrodos foi conectado a um estimulador elétrico programável (*Cardiac Stimulator, model SEC-2200*, Nikon-Kohden, Tokyo, Japan). Ambos os sinais de PA e dos eletrodos de estimulação foram coletados a uma frequência de amostragem de 3kHz por um sistema computadorizado de aquisição de dados (Aqdados, Lynx Tec. Eletron. SA, São Paulo, Brasil) e posteriormente armazenados em discos laser, para ulterior análise *off-line*.

Após um período de estabilização da preparação e de um registro basal da PA de aproximadamente 5 minutos, foi administrado propranolol (5mg/Kg, i.) para se remover a influência simpática sobre as respostas vagais cardíacas. Em seguida, após 5 minutos da administração de propranolol, foi administrado citrato de sildenafil (1mg/Kg, i.v.) ou veículo (SF 0,9%, 1 ml/Kg) em bolus via cateter instalado na veia jugular externa esquerda. Após 5 minutos, o protocolo de estimulação nervosa foi iniciado. Os eletrodos sob o vago foram conectados a um estimulador eletrônico computadorizado (*Cardiac Stimulator, model SEC-2200*, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) e o vago foi estimulado com trens de pulsos de onda quadrada (2ms, 9,5Volts, 16,7Hz) durante 2 minutos em frequências de trens variando aleatoriamente nas frequências pré-determinadas de 0,1Hz, 0,2Hz, 0,4Hz, 0,6Hz, 0,8Hz, 1,0Hz, 1,5Hz e 2,0Hz. (NAKAHARA et al., 1998; JULIEN et al., 1995). Esta faixa de frequência (0,1-2,0Hz) cobre suficientemente as faixas fisiológicas

de interesse. A estimulação elétrica em cada uma das frequências de trens acima descritas foi aplicada por um período de 2 minutos seguido de 4-5 minutos de recuperação. O estímulo elétrico do vago foi gravado, juntamente com a PA em computador com frequência de amostragem de 3KHz (FIG. 1). Ao final, os ratos foram eutanaziados por dose letal de anestésico injetado endovenosamente.

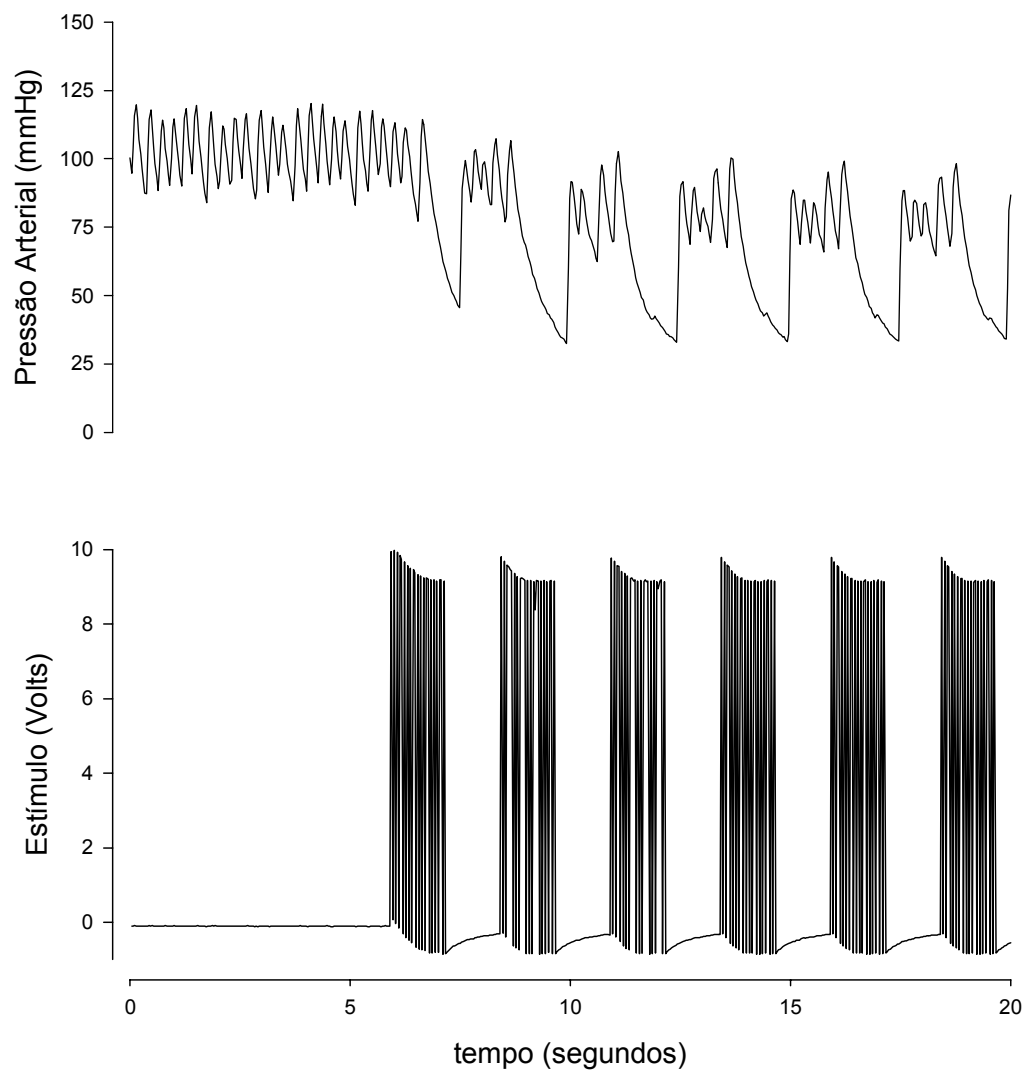


FIGURA 1. Registro simultâneo da pressão arterial (acima) e do estímulo elétrico a 0,4 Hz (em baixo) em um rato WKY anestesiado. Note a hipotensão e bradicardia durante o trem de impulsos.

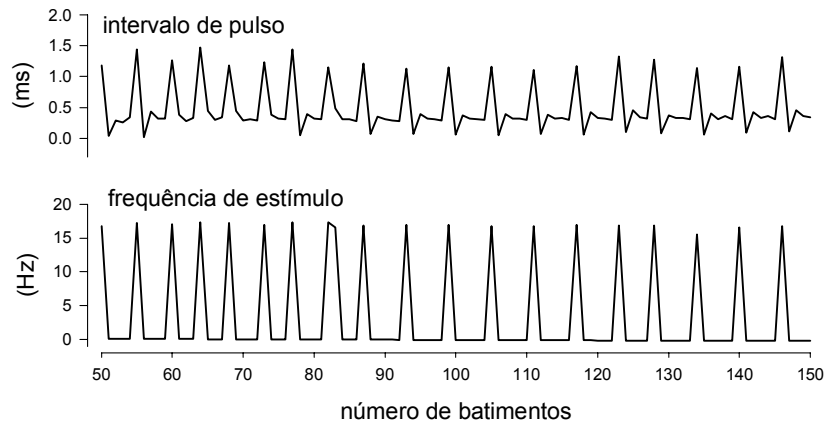
3.6. Análise dos Dados

Os parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca para os períodos basal (5 minutos), pós-propranolol (5 minutos) e pós-tratamento (5 minutos) foram estimados para cada animal experimental como a média de valores coletados batimento a batimento ao longo do tempo de coleta (5 minutos para cada etapa), empregando-se *software* de captura de picos locais de PA sistólica e diastólica (*ACKNOWLEDGE, BIOPAC INSTRUMENTS*).

Na análise das propriedades de transdução dinâmica do nervo vago cardíaco, estudado no protocolo, a função de transferência entre a frequência de estimulação elétrica (sinal de entrada) e a resposta da frequência cardíaca (sinal de saída) foi estimada empregando-se *software* apropriado (*Linear Analysis*), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Alberto Malliani, da Universidade de Milão, Itália.

Para tal, séries temporais de frequência de estimulação elétrica (em Hz) e de intervalo de pulso (em segundos) foram geradas por *software* através da detecção dos picos dos pulsos da estimulação elétrica, enquanto as séries temporais de intervalo de pulso foram geradas a partir da detecção dos intervalos de tempo entre picos de pressão sistólica sucessiva detectados do sinal de PA carotídea. Estes pares de séries temporais foram gerados para cada segmento com duração de 2 minutos correspondentes às frequências de trem individuais acima citadas (FIG. 2, painel superior). Para cada segmento, correspondente à uma frequência de trem individual, após a remoção de tendência linear, uma análise espectral auto-regressiva foi realizada para se obter os espectros de frequência do intervalo de pulso e da frequência de estimulação nervosa.

SÉRIES TEMPORAIS



ANÁLISE ESPECTRAL CRUZADA

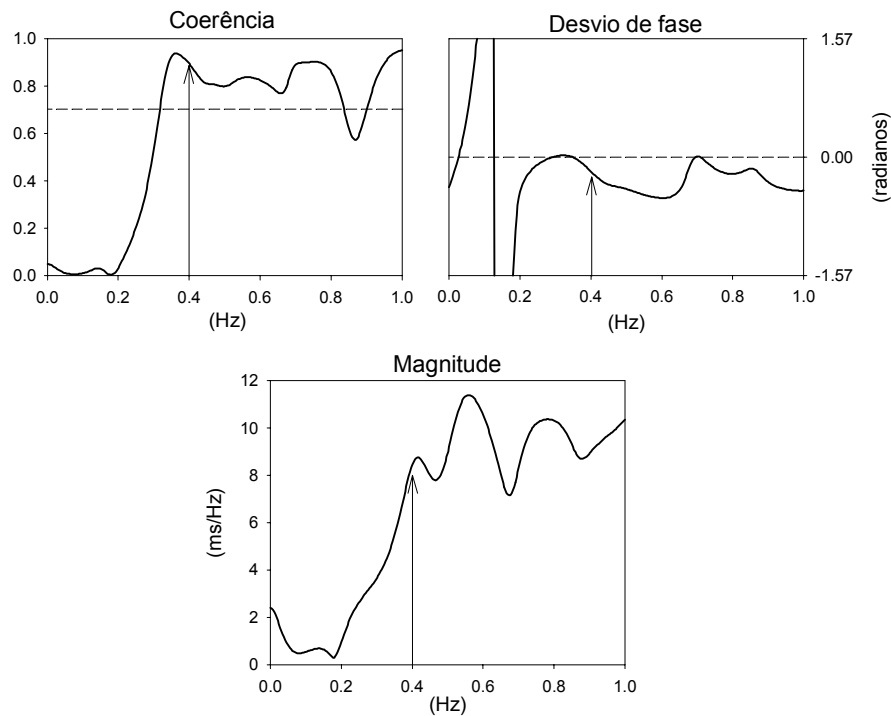


FIGURA 2. Painel superior: Séries temporais do intervalo de pulso e da frequência de estimulação (0,4 Hz) de um rato WKY anestesiado.

Painel inferior: Gráficos de coerência, desvio de fase e magnitude da função de transferência obtidos pela aplicação da análise espectral cruzada nas duas séries temporais mostradas no painel superior. Setas verticais indicam os valores coletados na frequência de estimulação de 0,4 Hz.

A seguir, uma análise espectral auto-regressiva bivariada foi utilizada para se calcular o espectro cruzado entre os dois sinais: a frequência de estimulação elétrica (como sinal de entrada) e o intervalo de pulso (como sinal de saída). Tal análise permitiu estimar a coerência, o desvio de fase entre os dois sinais, além da magnitude da função de transferência (FIG. 2, painel inferior). A coerência entre os sinais, que pode variar de 0 a 1 unidade, quantifica o grau de dependência linear entre os dois sinais. Um valor de coerência maior que 0,5 foi considerado como estatisticamente significativo. O desvio de fase (expresso em radianos), por sua vez, indica o retardo ou o avanço de tempo da entrada em relação à saída e no contexto experimental do presente projeto, indicaria o tempo necessário para que o estímulo elétrico do nervo provocasse uma resposta de bradicardia. Por fim, a magnitude da função de transferência indica a amplitude de alteração do intervalo de pulso por unidade de alteração da frequência de estimulação elétrica e foi expressa em ms/Hz. Esta magnitude representa uma estimativa do ganho da função de transferência entre o estímulo elétrico do nervo e a resposta cardíaca.

Os três parâmetros acima citados (coerência, desvio de fase e magnitude da função de transferência) foram assim estimados para cada uma das frequências de trem de estímulo usadas. Curvas coerência x frequência, desvio de fase x frequência e magnitude x frequência foram geradas para cada animal e comparadas entre os grupos de ratos normotensos e hipertensos tratados ou não com o citrato de sildenafil.

3.7. Análise Estatística

Todos os parâmetros foram expressos como média±erro padrão da média (EPM). Uma análise de variância de dois fatores (ANOVA *two way*) para medidas repetidas foi empregada para se avaliar os efeitos do tratamento (sildenafil x veículo) e do estado

pressórico (normotensão x hipertensão) sobre os parâmetros de pressão arterial média e frequência cardíaca durante a fase inicial pré-estimulação. Comparações múltiplas entre os diversos grupos foram posteriormente realizadas empregando-se o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para comparação das curvas: coerência x frequência, desvio de fase x frequência e magnitude x frequência, nos diferentes grupos estudados uma análise de variância multivariada (MANOVA) foi empregada seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. A diferença entre os parâmetros foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

No total, 39 animais foram empregados no presente estudo. Destes, 19 foram submetidos à realização do protocolo com administração de solução salina e 20 com administração de sildenafil. Os resultados estão apresentados na forma de média±EPM e ilustrados graficamente.

Conforme pode ser observado na FIG. 3, a administração de propranolol provocou uma significativa redução da PAM em ambos os grupos de animais normotensos. Após administração de salina, uma adicional queda significativa da PAM foi observada, porém de magnitude leve. No grupo que recebeu o sildenafil, uma queda significativa da PAM também foi observada. A PAM final após o sildenafil, foi significativamente menor que a PAM final observada no grupo normotenso que recebeu salina, indicando um efeito hipotensor significativo do sildenafil em animais normotensos (FIG. 3).

O comportamento da frequência cardíaca basal nos animais normotensos pode ser verificada na FIG. 4. Em ambos os grupos de animais normotensos, o propranolol provocou uma marcada redução da frequência cardíaca basal (de cerca de 360-380bpm para cerca de 200 bpm). A administração de citrato de sildenafil ou de veículo (salina) não provocou mudanças significativas nos valores de frequência cardíaca (FIG. 4), as quais foram idênticas nos dois grupos após 5 minutos de tratamento com o veículo ou o citrato de sildenafil (FIG. 4).

Conforme pode ser observado na FIG. 5, a administração de propranolol provocou uma significativa redução da PAM em ambos os grupos de animais SHRs. Após administração de salina, a PAM não foi modificada, enquanto no grupo que recebeu citrato de sildenafil, uma queda marcada adicional da PAM foi verificada (FIG. 5). A PAM final após o sildenafil foi significativamente menor que a PAM final observada no grupo SHR

que recebeu salina, indicando um efeito hipotensor significativo do sildenafil em animais SHR (FIG. 5).

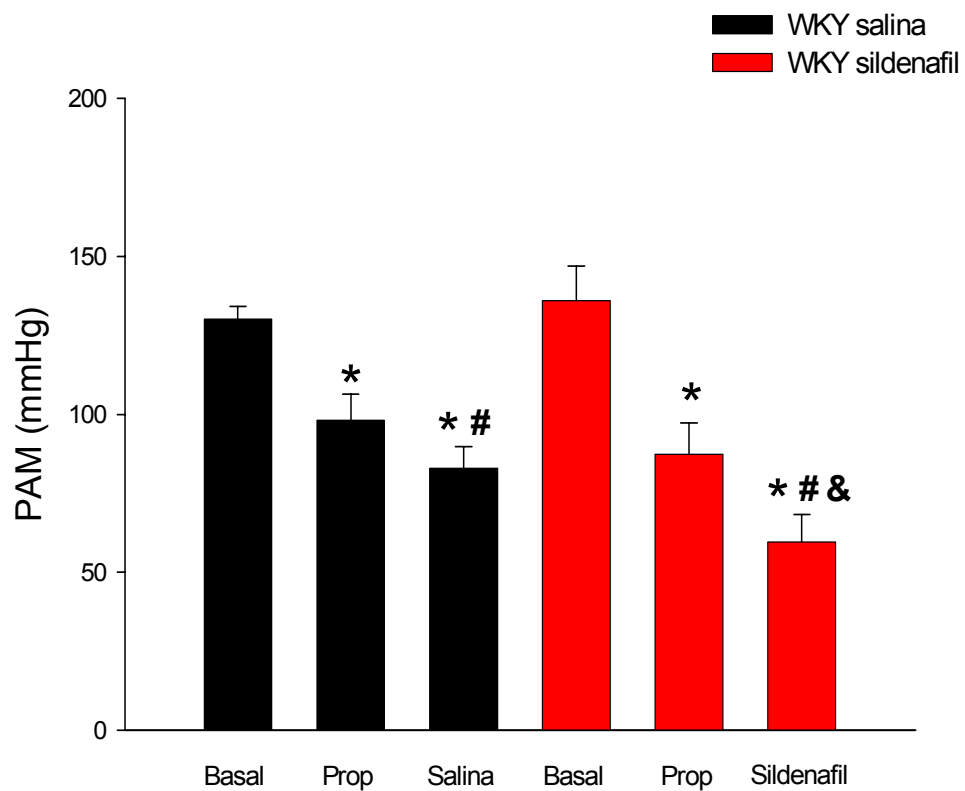


FIGURA 3. Valores médios (\pm EPM) da pressão arterial média (PAM) em ratos normotensos tratado com sildenafil ou salina (* $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina).

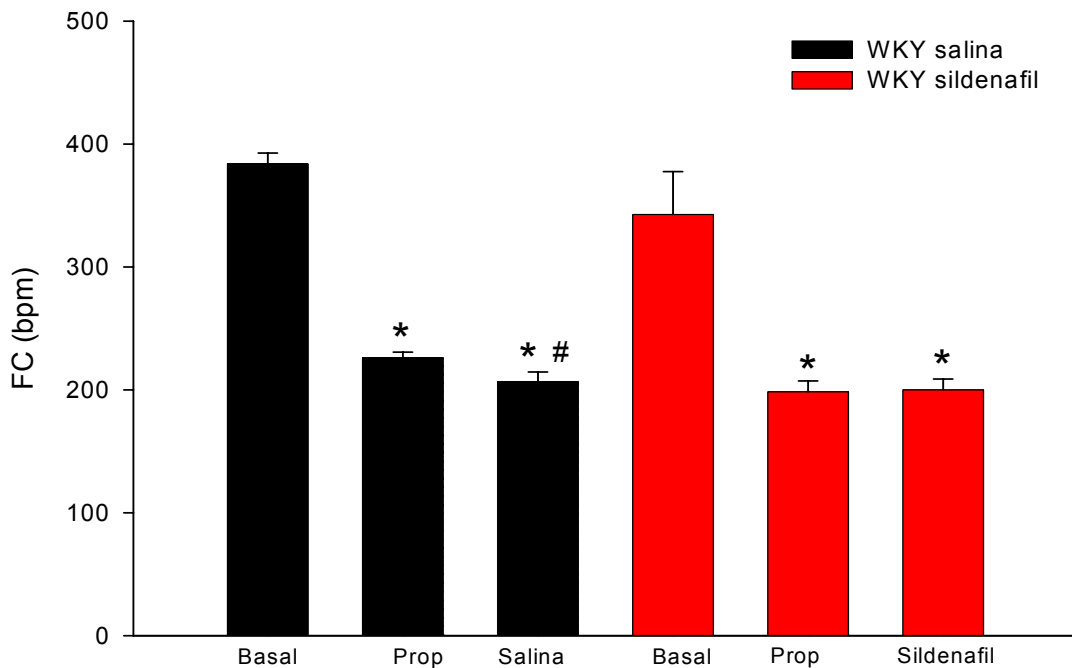


FIGURA 4. Valores médios (\pm EPM) da frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos tratado com citrato de sildenafil ou salina * $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop).

O comportamento da frequência cardíaca basal nos animais SHR pode ser verificado na FIG. 6. Em ambos os grupos de animais normotensos, o propranolol provocou uma marcada redução da frequência cardíaca basal (de cerca de 360-380bpm para cerca de 220 bpm). A administração de veículo (salina) não provocou mudanças significativas nos valores de frequência cardíaca (FIG. 4), enquanto que a administração de citrato de sildenafil provocou uma leve, porém significativa, elevação da frequência cardíaca final, a qual foi significativamente diferente da frequência cardiopática final do grupo SHR controle (FIG. 6).

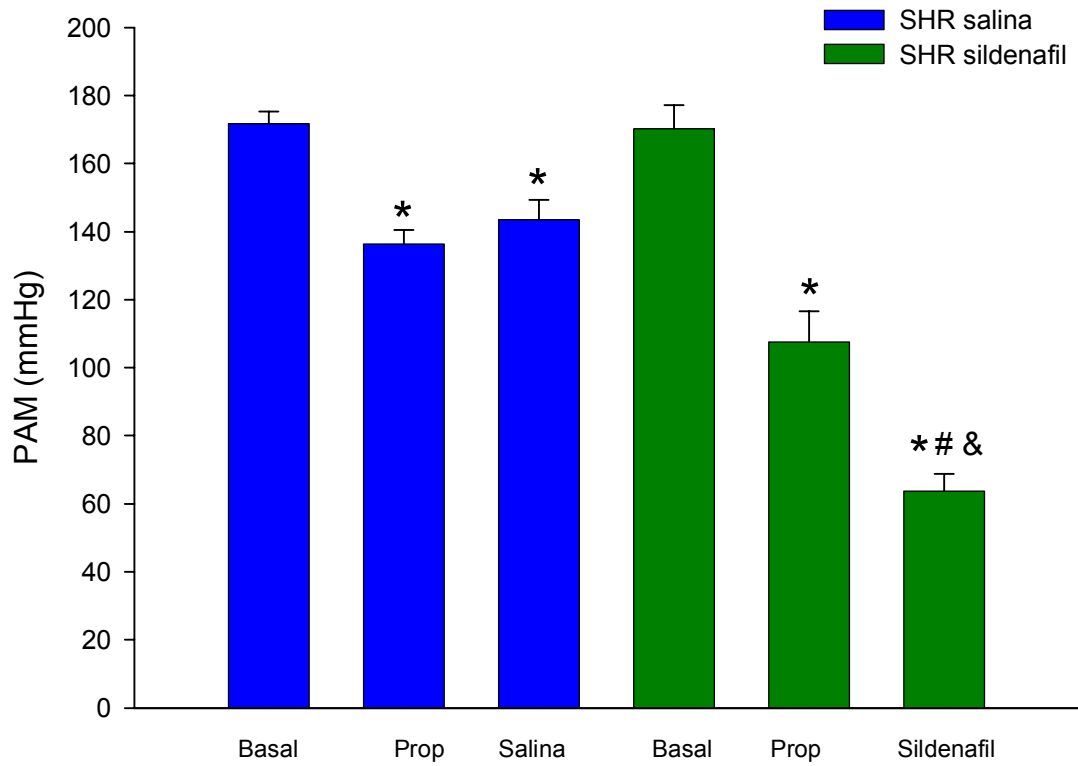


FIGURA 5. Valores médios (\pm EPM) da PAM em ratos hipertensos tratados com citrato de sildenafil ou salina * $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina.

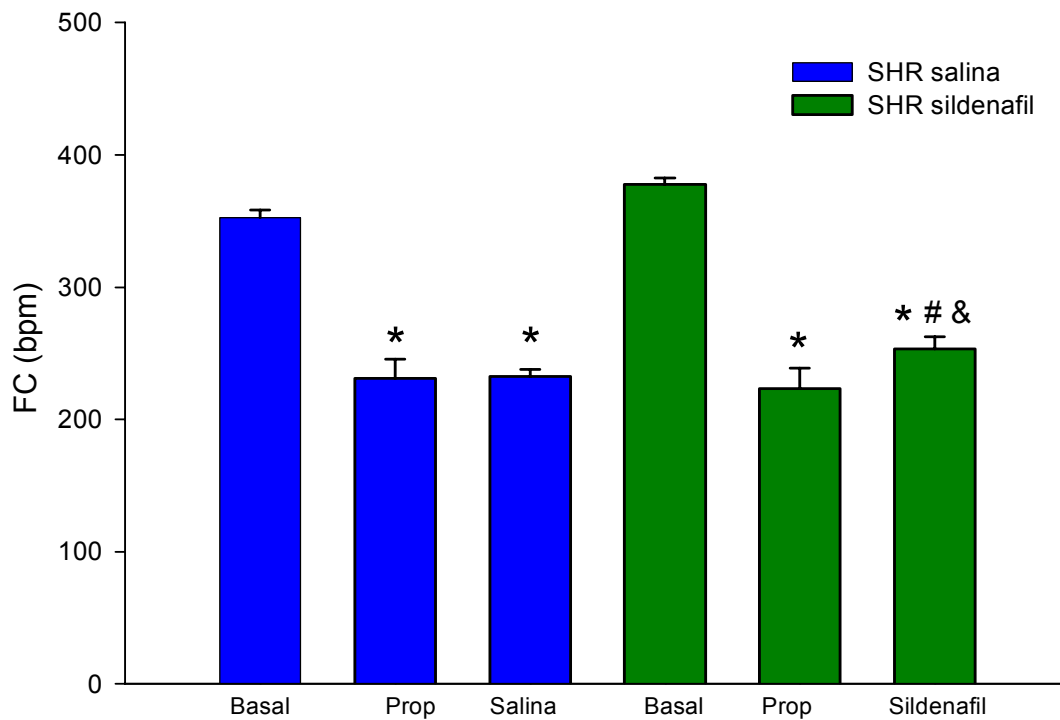


Figura 6. Valores médios (\pm EPM) da frequência cardíaca em ratos hipertensos tratados com citrato de sildenafil ou salina * $P < 0,05$ versus basal, # $P < 0,05$ versus propranolol (prop), & $P < 0,05$ versus salina.

Os valores da coerência nas diversas frequências de estimulação nos grupos normotensos e hipertensos tratados ou não com citrato de sildenafil não apresentaram diferenças significantes entre si (FIG. 7), apresentando sempre valores muito próximos de uma unidade (1), indicativo de uma forte dependência linear da resposta da frequência cardíaca à estimulação vagal.

Os valores do desvio de fase entre a estimulação vagal e a resposta do intervalo de pulso não diferiram entre os grupos normotensos e hipertensos tratados ou não com citrato

de sildenafil (FIG. 8), indicando que a relação temporal entre o estímulo elétrico do nervo vago e a resposta do intervalo de pulso cardíaco não sofreu modificações dependentes do estado pressórico nem do tratamento com sildenafil.

Os valores da magnitude da função de transferência entre a estimulação vagal e o intervalo de pulso dos animais hipertensos tratados com salina foram significativamente maiores que os valores dos animais normotensos tratados com salina, em todas as faixas de frequências estudadas, indicando um maior ganho dinâmico da função vagal cardíaca periférica nos animais SHR em comparação com os normotensos. Porém, seja nos normotensos ou nos hipertensos, o tratamento com sildenafil não afetou de forma significativa a magnitude da função de transferência (FIG. 9).

Na TAB. 1 estão quantificados os valores médios (\pm EPM) para as coerências, os desvios de fase e as magnitudes da função de transferência calculados como médias nas faixas de frequências de 0,2 a 0,8 Hz, representativa da faixa de baixa frequência da variabilidade da FC (banda LF- *low frequency*) e de 1,0 a 2,0Hz, representativa da faixa de alta frequência da variabilidade da FC (banda HF – *high frequency*).

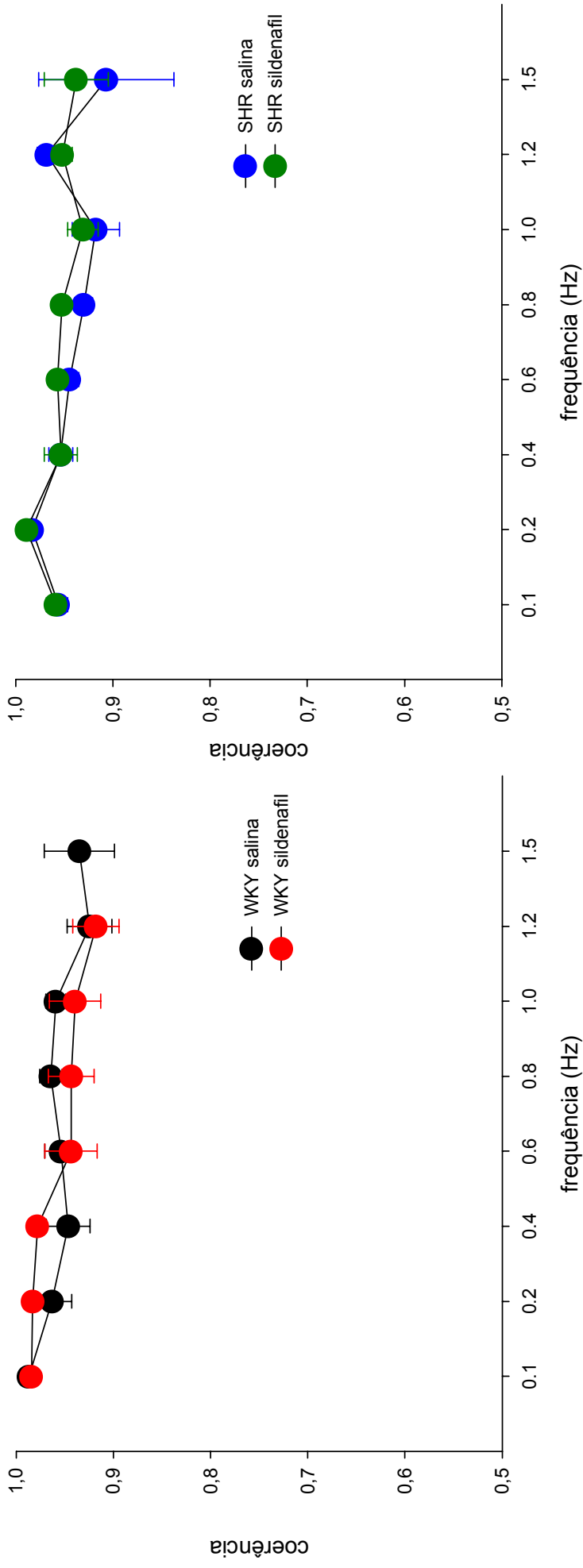


Figura 7. Valores médios (\pm EPM) da coerência entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas nos ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e sildenafil.

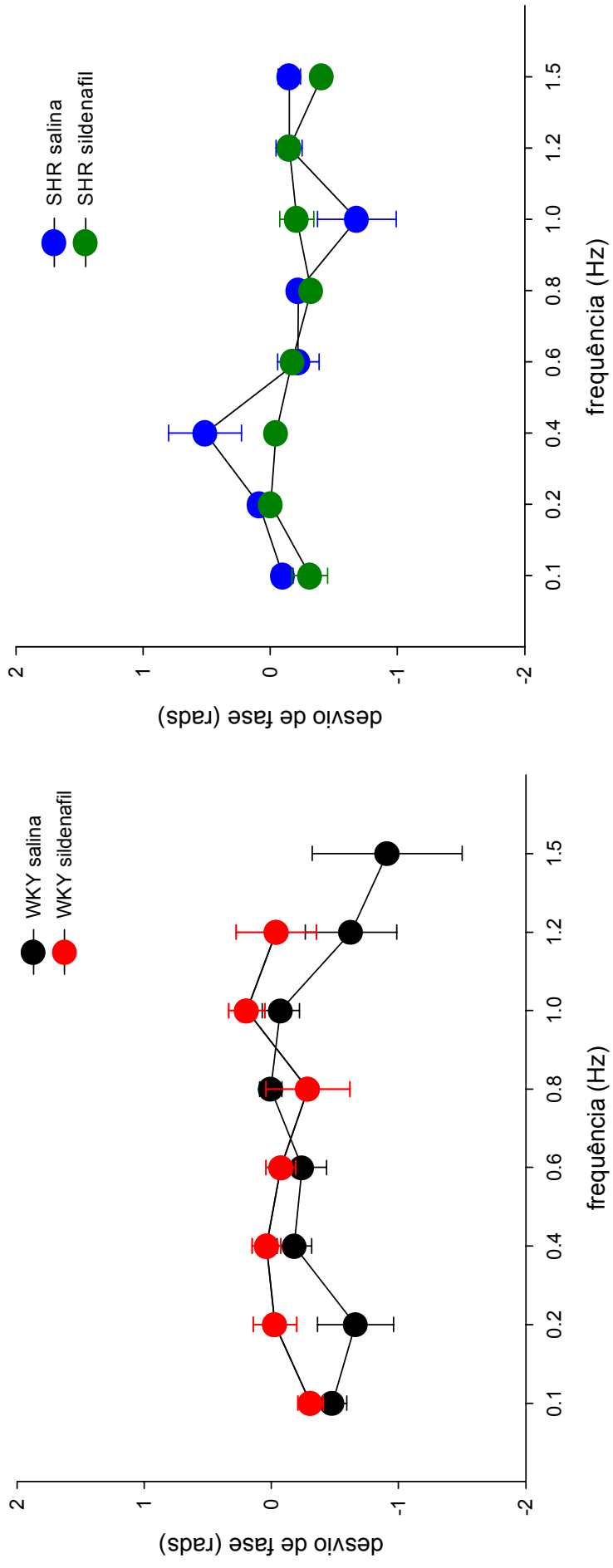


Figura 8. Valores médios (\pm EPM) do desvio de fase entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas em ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e sildenafil.

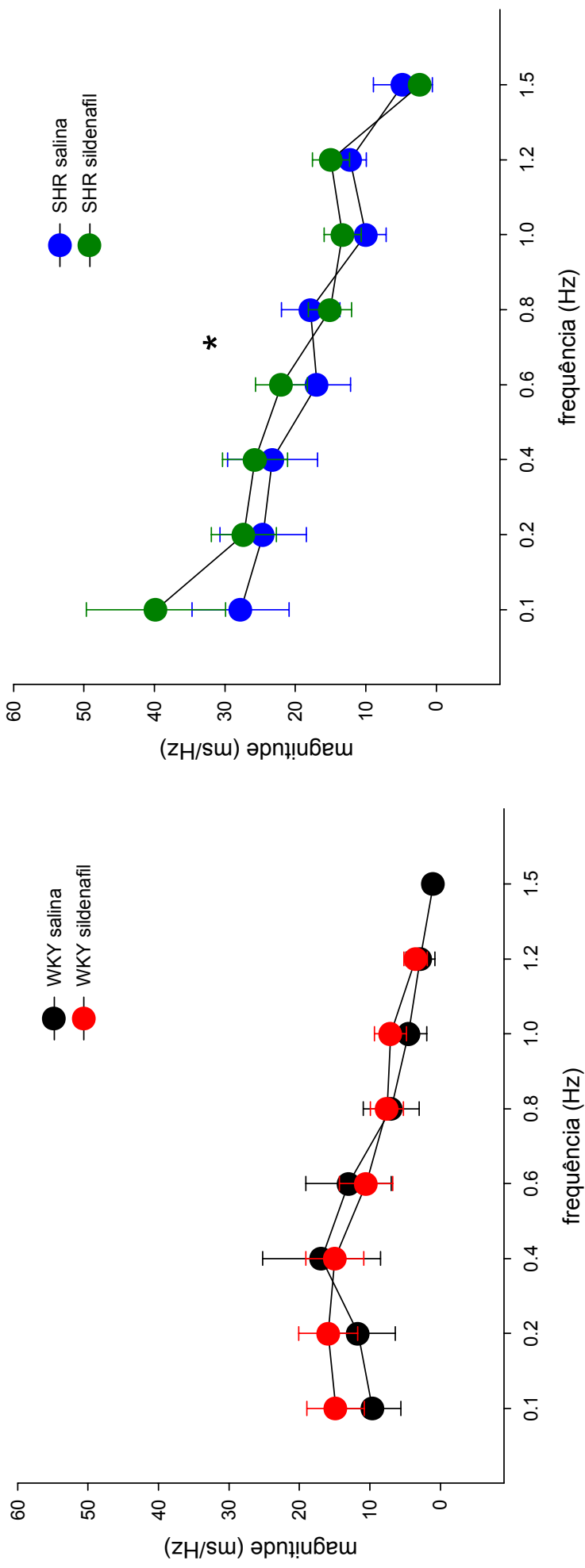


FIGURA 9. Valores médios (\pm EPM) magnitude da função de transferência entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso nas diversas frequências utilizadas em ratos normotensos e hipertensos tratados com solução salina e citrato de sildenafil (* $P < 0,05$ para o efeito hipertensão x normotensão).

TABELA 1. Valores médios (\pm EPM) dos parâmetros de magnitude da função de transferência, desvio de fase e coerência entre a frequência do estímulo elétrico vagal e o intervalo de pulso de ratos WKY ou SHR tratados com salina ou sildenafil, calculados como médias nas faixas de baixa (0,2-0,8Hz, LF) e alta frequências (1,0-2,0Hz).

FAIXAS	WKY	WKY	SHR	SHR
	SALINA (N=9)	SILDENAFIL (N=10)	SALINA (N=10)	SILDENAFIL (N=10)
<i>Magnitude (ms/Hz)</i>				
Faixa LF	12,14 \pm 5,28	12,23 \pm 2,97	20,87 \pm 4,36*	21,40 \pm 3,68*
Faixa HF	3,92 \pm 2,07	6,44 \pm 2,09	11,15 \pm 2,25*	11,45 \pm 2,26*
<i>Desvio de fase (rads)</i>				
Faixa LF	-0,27 \pm 0,12	-0,09 \pm 0,10	-0,06 \pm 0,07	-0,08 \pm 0,04
Faixa HF	-0,29 \pm 0,20	-0,17 \pm 0,16	-0,36 \pm 0,12	-0,21 \pm 0,11
<i>Coerência</i>				
Faixa LF	0,96 \pm 0,01	0,96 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,96 \pm 0,01
Faixa HF	0,95 \pm 0,01	0,94 \pm 0,02	0,94 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01

* P<0,05 comparado ao grupo WKY salina.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são que o tratamento agudo com citrato de sildenafil em ratos normotensos controles e espontaneamente hipertensos provoca diminuição significativa da pressão arterial média em ambos os grupos, acompanhada de frequência cardíaca inalterada em ratos normotensos e de taquicardia em ratos hipertensos. Além disso, o tratamento com sildenafil, seja em ratos normotensos seja em SHRs, não modificou as propriedades de transdução dinâmica no nervo vago cardíaco periférico em ambas as cepas de rato.

Prévio à administração do citrato de sildenafil ou do veículo, ao longo da execução do protocolo experimental, foi feita a administração de propranolol, a fim de eliminar eventuais influências simpáticas sobre a modulação vagal cardíaca periférica. A administração aguda de propranolol provocou uma marcada hipotensão e bradicardia em ambos animais normotensos e hipertensos. Esta hipotensão associada ao propranolol seguramente está relacionada às suas propriedades β -bloqueadoras que, ao provocar uma considerável bradicardia e ao mesmo tempo uma depressão da contratilidade miocárdica por antagonismo da inervação simpática, leva à uma significativa redução do débito cardíaco, com conseqüente redução da pressão arterial. (HOFFMAN, 2003)

Além disso, não poderíamos descartar um possível efeito vascular do β -bloqueador promovendo vasodilatação e conseqüente redução da resistência periférica por uma ação indireta, através do bloqueio de receptores beta-adrenérgicos pré-sinápticos simpáticos excitatórios, da inibição de liberação de renina, da estimulação da síntese de prostaglandinas vasodilatadoras, etc. (HOFFMAN, 2003)

Por outro lado, o efeito vasodilatador do citrato de sildenafil é comprovado pela diminuição da pressão arterial, conforme encontrado na literatura (BRINDIS & KLONER,

2003; REFFELMANN & KLONER, 2003; OCKAILI et al., 2002; PICCIRILLO et al., 2002; VARDI et al., 2002). Esta droga atua na via NO-GMPc competindo com a enzima PDE-5 e impede a degradação do GMPc (CORBIN & FRANCIS, 1999).

Sob a ação do NO e a inibição da PDE-5 com o sildenafil, observa-se um acúmulo do GMPc e via ativação da proteína quinase G (PKG), inicia uma cascata de eventos de fosforilação que culmina no relaxamento do músculo liso vascular e na conseqüente vasodilatação. (CORBIN & FRANCIS, 1999)

Vários estudos em seres humanos comprovam a ação do sildenafil em diminuir a PAM, tanto sistólica quanto diastólica, associada à diminuição da resistência vascular sistêmica, *in vivo*, com a administração de doses endovenosas de 20, 40 e 80mg. Em pacientes com doença da artéria coronária, o sildenafil pode causar pequena, mas significativa diminuição da pressão arterial sistêmica e pulmonar, não alterando a pressão dos capilares pulmonares e não alterando a frequência cardíaca. Seu efeito vasodilatador é também observado nos vasos coronários, regulando o fluxo sanguíneo coronariano, sendo que a resposta da resistência vascular coronária à acetilcolina e ao verapamil não foi alterada pelo sildenafil. Porém, a ação vasodilatadora do sildenafil no leito coronário foi aumentada pela nitroglicerina. (BRINDIS & KLONER, 2003)

A melhora do tônus vascular coronário nos segmentos mediais e distais tanto nos pacientes com CAD quanto nos controles, decorre da vasodilatação destes segmentos estenosados da artéria coronária. (HALCOX et al., 2002)

O NO age na modulação cardíaca vagal e seus efeitos sobre o controle barorreflexo da frequência cardíaca levam a um aumento do ganho barorreflexo. (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999). No presente estudo, observou-se um aumento significativo da FC após administração de sildenafil em ratos hipertensos. Encontram-se estudos na literatura que comprovam o aumento da FC (REFFELMANN et al., 2003; PICCIRILLO et al., 2002;

SCHALCHER et al., 2002), provavelmente devido à taquicardia reflexa, conseqüente da vasodilatação provocada pelo sildenafil. Porém, outros estudos não encontraram nenhuma alteração na FC (BRINDIS & KLONER, 2003; HALCOX et al., 2002; VARDI et al., 2002; PHILIPS et al., 2000), provavelmente por que a vasodilatação não foi suficiente para provocar a taquicardia reflexa.

Em nossos animais normotensos nenhuma taquicardia foi observada, o que provavelmente decorre tanto da menor hipotensão verificada nestes animais, como da depressão da resposta barorreflexa decorrente do estado de anestesia em que os animais se encontravam. Este mesmo estado de anestesia também poderia auxiliar na explicação da pequena magnitude da taquicardia reflexa observada nos animais hipertensos, a despeito da tremenda hipotensão observada.

Como a resposta de taquicardia foi observada em uma condição de bloqueio simpático cardíaco prévio com o propranolol, a mesma somente poderia decorrer de uma retirada parassimpática vagal cardíaca, mediada pelo barorreflexo em resposta à marcada hipotensão arterial observada nos SHR após a administração do sildenafil. Tal resposta poderia sugerir uma melhora no ganho baroreflexo vagal cardíaco induzido pelo sildenafil, confirmando achados existentes na literatura. (CHOWDHARY & TOWNEND, 1999) Porém, tal conclusão fica bastante prejudicada pela concomitante vigência de um estado anestésico que sabidamente prejudica a resposta barorreflexa cardíaca.

Em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC), após a administração de sildenafil (por via oral), houve uma diminuição significativa da PAM, acompanhado de encurtamento do intervalo RR e prolongamento do intervalo QT, alterando assim a repolarização cardíaca. Um aumento significativamente da FC também foi observado (PICCIRILLO et al., 2002). Nos pacientes com ICC, a relação LF/HF, um marcador do balanço simpato-vagal cardíaco, foi aumentada pelo sildenafil, ou seja, houve um aumento

a atividade simpática após o sildenafil. O aumento de intervalo QT foi maior no grupo ICC tratado com sildenafil e este aumento está relacionado com a severidade da ICC e a presença de arritmias malignas. (PICCIRILLO et al., 2002)

A avaliação dos efeitos do sildenafil no contexto da hipertensão arterial em seres humanos tem sido pouco explorada. O tratamento de homens hipertensos com sildenafil (por via oral) provocou uma pequena, mas significativa, diminuição da PAS, PAD e PAM, não sendo significativas as alterações da FC. Este efeito é acentuado pelo exercício físico aeróbico. A idade também afeta significativamente a redução da PA, ocorrendo uma maior diminuição da PA em pacientes mais velhos (VARDI et al. 2002). Comparativamente, a resposta de hipotensão observada em nossos animais demonstra uma maior redução da PAM nos animais hipertensos em comparação com os animais normotensos, sugerindo uma maior sensibilidade ao sildenafil no contexto da hipertensão arterial.

No presente estudo, a estimulação do nervo vago cardíaco foi aplicada em SHR e WKY em trens de estímulos em frequências próximas das faixas fisiológicas de ação do nervo vago, incluindo as faixas de baixa (LF: 0,2–0,8Hz) e alta frequência (HF: 1,0–2,0Hz), observadas em condição fisiológica não somente em ratos como em outras espécies. Tal condição de estimulação, mais próxima do real funcionamento do nervo vago, torna este estudo único pelo modo de avaliação da função vagal eferente cardíaca em ratos, já que na maioria dos estudos anteriores, usaram-se estímulos em frequências contínuas e crescentes, sem representação fisiológica, em sua grande maioria. (MINAMI & HEAD 2000; FERRARI et al., 1992; FERRARI et al., 1991)

Tanto em ratos WKY como em SHR, a magnitude da função de transferência entre a frequência dos trens de estímulo vagal e o intervalo de pulso (IP) foi elevada em frequências mais baixas (faixa de LF), reduzindo-se para valores menores em frequências mais altas (faixa de HF). Tal efeito evidencia um comportamento de filtro de primeira

ordem com retardo de tempo na transferência da influência vagal para o coração, como atestado para outras espécies. (MIYAMOTO et al., 2004; MIYAMOTO et al., 2003; KAWADA et al., 2000; NAKAHARA et al., 1998)

A magnitude da função de transferência entre duas variáveis quantifica a relação entre elas. Isto é, ela representa o quanto uma variável se altera na dependência de alteração da outra. Assim sendo, entendemos que a magnitude da função de transferência entre a frequência de estimulação vagal e o intervalo de pulso representa um índice confiável de integridade funcional do nervo vago (PAGANI et al., 1988). Desse modo, em vez de analisar, simplesmente as respostas bradicárdicas à estimulação vagal com frequências constantes, como realizado em estudos anteriores (MINAMI & HEAD 2000; FERRARI et al., 1992; FERRARI et al., 1991), utilizamos o domínio da frequência para determinar o quanto a estimulação vagal é capaz de afetar o intervalo de pulso dos ratos normotensos ou hipertensos.

Fisiologicamente, a frequência de disparos do componente parassimpático vagal cardíaco oscila, principalmente, na faixa da frequência respiratória tanto em seres humanos como em animais de laboratório, entre 1,0 a 2,0Hz no rato (CERUTTI et al., 1991; PARATTI et al., 1995; PAGANI et al., 1994; PAGANI et al., 1986). Entretanto, oscilações de baixa frequência, entre 0,2 a 0,8Hz no rato, também podem ser observadas nas descargas dos nervos vagos cardíacos. (MALLIANI et al., 1991)

Em todas as frequências de estimulação utilizadas, a magnitude da função de transferência foi significativamente maior nos ratos hipertensos do que nos normotensos. Assim, esses resultados sugerem fortemente um aumento na transferência das oscilações parassimpáticas vagais para o coração nos ratos hipertensos, ao menos nas faixas de frequência estudadas. Esse fato parece confirmar observações iniciais obtidas em SHR jovens de uma maior sensibilidade cardíaca à estimulação do nervo vago periférico (HEAD

& ADAMS, 1988), embora pareça estar em contradição com a menor sensibilidade baroreflexa cardíaca apresentada pelos ratos espontaneamente hipertensos adultos e amplamente descritos na literatura. (FAZAN JR et al., 2001)

Ao lado dos achados relativos à magnitude da função de transferência, pode-se observar tanto na faixa LF quanto na faixa HF, desvios de fase semelhantes sejam em ratos normotensos, ou em ratos hipertensos SHR, indicando que nas faixas de frequências estudadas não ocorreram modificações no tempo requerido para que a estimulação vagal afetasse o nó sinusal. Se considerarmos que, ao estimular o vago periférico na região cervical, estamos estimulando as fibras parassimpáticas vagais pré-gangliônicas, duas sinapses precisam ser ativadas entre o estímulo elétrico no vago e a resposta de bradicardia: a sinapse entre axônio pré-ganglionar e neurônio pós-ganglionar e a sinapse neuroefetora entre axônio pós-ganglionar e o nó sino-atrial. O desvio de fase encontrado para os animais WKY e SHR, correspondendo a um retardo de tempo entre 0,06-0,09 segundos, confirma dados prévios da literatura obtidos em ratos normotensos. (MINAMI & HEAD, 2000; FERRARI et al., 1992; FERRARI et al., 1992)

Embora o desenho do presente estudo não permita explicitar as causas do aumento da função vagal cardíaca periférica observada em SHR, algumas possíveis explicações podem ser citadas. Uma delas poderia ser a influência da hiperatividade simpática cardíaca, observada em SHRs, a qual poderia estar atenuando a função nervosa vagal (BERNE & LEVY, 2004) via efeitos pré-sinápticos com conseqüente redução da liberação de acetilcolina na fenda sináptica. A redução crônica da liberação de acetilcolina poderia, por sua vez, desencadear o fenômeno da supra-regulação de receptores muscarínicos no nó sinusal (*up-regulation* de receptores), deixando estes mais sensíveis aos estímulos elétricos vagais, aumentando assim o ganho dinâmico da inervação vagal periférica. Tal explicação, porém, não pode ser confirmada no presente estudo, uma vez que nenhuma tentativa foi

feita para se avaliar uma maior resposta muscarínica cardíaca a agonistas colinérgicos ou para se avaliar uma expressão aumentada de RNA mensageiro ou dos próprios receptores muscarínicos cardíacos. Entretanto, Ferrari et al. (1992) demonstraram em SHR de 12 semanas de idade uma hiperresponsividade à estimulação elétrica vagal cardíaca, a qual foi associada à uma maior resposta à metacolina, agonista muscarínico, sugerindo fortemente a ocorrência do fenômeno de *up-regulation* ou aumento de sensibilidade de receptores colinérgicos em corações de SHR. (FERRARI et al., 1992).

Tal suposição foi em parte confirmada por estudo de Fu et al. (1994) que demonstraram uma expressão aumentada de RNA mensageiro para a proteína Gi-alfa2 cardíaca em SHRs. Esta proteína Gi é a responsável pelo acoplamento do receptor muscarínico M2 à cascata de sinalização que culmina com a redução de AMPc e indução de bradicardia (FU et al., 1994). A hiperresponsividade cardíaca à estimulação vagal periférica é também observada em outras condições associadas com uma depressão de origem central na modulação vagal cardíaca como no envelhecimento (FERRARI et al., 1991; NARAYANAN & DERBY, 1983), no diabetes mellitus (DALL'AGO et al., 2002) e na desnervação sino-aórtica experimental em ratos (SOARES et al., 2006; CHIANCA JR. & MACHADO, 1994), sugerindo que esta modificação seja um mecanismo compensação encontrado pela inervação vagal cardíaca para tentar manter dentro de certos limites de normalidade o controle autonômico cardíaco.

Por outro lado, o sistema renina-angiotensina poderia também ser um bom candidato a ser considerado, já que trabalhos anteriores (POTTER, 1982) têm demonstrado um efeito inibitório da angiotensina II em neurônios pós-ganglionares vagais, além do que é amplamente descrito a hiperatividade do sistema renina angiotensina tecidual em SHR (VARAGIC & FROHLICH, 2002; MANCIA et al., 1995). Da mesma forma, a redução crônica da atividade neuronal vagal em nível do nó sinusal decorrente da hiperatividade do

sistema renina-angiotensina poderia levar a um fenômeno de *up-regulation* de receptores, como descrito acima, na tentativa de compensar a redução crônica da liberação de acetilcolina em SHRs. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para a confirmação destas hipóteses.

O tratamento agudo com citrato de sildenafil não provocou mudanças nas propriedades de transdução dinâmicas do nervo vago cardíaco, seja em animais WKY ou em animais SHR. Tal resultado, à primeira vista, foi inesperado uma vez que a grande maioria dos relatos da literatura parecem indicar um papel efetivo da via da L-Arginina-NO-GMPc na potenciação de respostas vagais cardíacas tanto central quanto periféricamente. (CHOWDHARY et al., 2004; MOHAN et al., 2002; CHOATE et al., 2001; HERRING & PATERSON, 2001; CHOWDHARY & TOWNEND, 1999; CONLON & KIDD, 1999; HAN et al., 1998; SEARS et al., 1998; ELVAN et al., 1997; ARMOUR et al., 1995; TAGAWA et al., 1994; TRAVAGLI & GILLIS, 1994; KLIMASCHEWSKI et al., 1992)

O protocolo experimental utilizado no presente trabalho não permite uma adequada explicação para a ausência de efeito do citrato de sildenafil sobre as respostas cardíacas à estimulação elétrica parassimpática vagal. Entretanto, algumas especulações podem ser feitas. Primeiramente, importante contingente do efeito potenciador da resposta vagal induzida pela via do NO-GMPc se deve a efeitos neurais diretos, seja em neurônios pré-ganglionares vagais centrais (TAGAWA et al., 1994; TRAVAGLI & GILLIS, 1994) ou na pré-sinapse neuro-efetora cardíaca, em nível de nó SA. (CHOWDHARY et al., 2004; MOHAN et al., 2002; CHOATE et al., 2001; HERRING & PATERSON, 2001; CHOWDHARY & TOWNEND, 1999; CONLON & KIDD, 1999; HAN et al., 1998; SEARS et al., 1998; ELVAN et al., 1997; ARMOUR et al., 1995; KLIMASCHEWSKI et al., 1992)

Embora a expressão de fosfodiesterase-5 tenha sido comprovada para o cardiomiócitos isolados de ratos (DAS et al., 2005), não existe na literatura nenhum dado que confirme a expressão de fosfodiesterase-5 em neurônios ganglionares vagais cardíacos. É possível que tais neurônios não expressem a fosfodiesterase-5, não sendo assim passíveis de potenciação do GMPc e de seus efeitos potenciadores da resposta vagal cardíaca. Ou ainda, é possível que mesmo que eles expressem a fosfodiesterase-5, a inibição da mesma pelo sildenafil poderia ser compensada pela expressão de outras isoformas não inibidas pelo sildenafil e igualmente capazes de degradar o GMPc, como as isoformas PDE1B e PDE2, as quais têm sido descritas em neurônios. (BENDER & BEAVO, 2004)

A inibição da fosfodiesterase-5 em cardiomiócitos, em especial no nó SA, *per se* poderia também afetar a resposta cardíaca à estimulação vagal. Porém, uma potenciação do GMPc em cardiomiócitos isolados poderia ter efeitos mutuamente excludentes já que, se por um lado, a proteína quinase G ativada pelo GMPc inibe correntes de entrada de cálcio do tipo lenta que levariam a bradicardia (FISCHMEISTER et al., 2005), por outro lado ela ativa correntes de marcapasso If, o que provocaria uma resposta taquicárdica (MUSIALEK et al., 1997). O balanço final de tais efeitos acabaria por ser uma frequência cardíaca inalterada frente a uma estimulação vagal. Entretanto, todas as eventuais explicações acima especuladas necessitam de comprovação experimental em estudos futuros.

Embora os resultados obtidos com o tratamento com sildenafil tenham sido inesperadamente negativos, tais achados, em nossa opinião, não deixam de ter alguma relevância clínica. É bem descrito que o uso agudo de citrato de sildenafil para disfunção erétil pode cursar com hipotensão arterial e taquicardia decorrente de uma hiperativação simpática reflexa (PHILIPS et al., 2000), as quais, se muito acentuadas, podem colocar em risco a vida dos usuários deste fármaco, por aumentar a incidência de episódio de arritmias cardíacas graves e de morte súbita (ARORA et al., 1999; CHEITLIN et al., 1999). Tais

efeitos colaterais são mais intensos em indivíduos com hiperatividade simpática de base como aqueles com insuficiência cardíaca e em uso de vasodilatadores à base de nitratos, os quais potenciam também a via do NO-GMPc (ARORA et al., 1999; CHEITLIN et al., 1999). A falta de uma ação estimulatória vagal periférica evidenciada por nossos achados negativos poderia ajudar a explicar o aumento no risco cardiovascular aumentado nestes pacientes, uma vez que a taquicardia reflexa de corrente da hiperexcitação simpática não seria contrabalançada a contento por uma potenciação da resposta vagal, que seria protetora contra o desenvolvimento de eventos arritmogênicos cardíacos.

O presente estudo possui algumas importantes limitações principalmente relacionadas ao emprego de um protocolo de estimulação nervosa em animais anestesiados. Porém, o emprego de protocolo parecido em animais conscientes é de difícil execução (LI et al., 2004) e ainda pouco específico, já que o nervo vago deve permanecer intacto e fibras aferentes acabariam por ser estimuladas. Além disso, nenhum protocolo experimental adicional foi empregado para se explicar, do ponto de vista mecanístico, os achados negativos encontrados com o sildenafil.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, os efeitos do citrato de sildenafil sobre as propriedades de transdução dinâmica do nervo parassimpático vagal cardíaco em ratos normotensos e em ratos espontaneamente hipertensos. Os principais achados do presente estudo foram:

1. As propriedades de transdução dinâmica no nervo vago cardíaco encontram-se aumentadas em animais hipertensos de 16 semanas de idade, em comparação com os animais normotensos controles, evidenciando uma potenciação funcional do nervo vago periférico dos SHR, a qual poderia ser decorrente de uma resposta compensatória periférica a uma depressão vagal cardíaca central muito bem descrita nesta cepa;
2. O tratamento com citrato de sildenafil, seja em ratos normotensos seja em SHRs, não modificou as propriedades de transdução dinâmicas no nervo vago cardíaco periférico, sugerindo que a fosfodiesterase-5 vagal cardíaca periférica não desempenha um papel significativo na modulação dinâmica vagal cardíaca.

Tais resultados sugerem assim que, dentre os efeitos autonômicos do citrato de sildenafil, um efeito no nervo vago periférico em ratos normotensos e hipertensos espontâneos pode ser descartado.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. A. et al. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. **Hypertension**. 1989, n.14, p.191-202.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart and stroke facts: statistical supplement. Dallas: **AHA**, 1996. 23p .

ANDRESEN, M. C.; BROWN, A. M. Baroreceptor function in spontaneously hypertensive rats. Effect of preventing hypertension. **Circ. Res.** 1980, n.47, p.829-834.

ARMOUR, J. A. et al. Modulation of intrinsic cardiac neuronal activity by nitric oxide donors induces cardiodynamic changes. **Am J Physiol**. 1995; n.268, p.R403–R413.

ARORA, R. R. et al. Acute myocardial infarction after the use of sildenafil. **N Engl J Med**. 1999, n.341, p.700.

BALLIGAND, J. L. Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide. **Cardiovasc Res**. 1999, n.43, p.607–620.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. **Neurochem Int**. 2004, n.45, p.853-857.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Regulation of the heart. In: **PHYSIOLOGY**. 5.ed. St. Louis: Mosby-Year Book, p. 417-437, 2003.

BRINDIS, R. G.; KLONER, R. A. Sildenafil in patients with cardiovascular disease. **Am J Cardiol**. 2003, v.92, n.9A, p.26M-36M.

CERUTTI, C. et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **Am. J. Physiol**. 1991, n.261, p.H1292-H1299.

CERUTTI, C. et al. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. **Am. J. Physiol.** 1994, n.266, p.H1293-H2000.

CHEITLIN, M. D., et al. Use of sildenafil (Viagra) in patients with cardiovascular disease. **J Am Coll Cardiol.** 1999, n.33, p.273–282.

CHIANCA JR., D.A.; MACHADO, B. H. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. **Braz J Med Biol Res.** 1994, n.27, p.775-781.

CHOATE, J. K. et al. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. **Am J Physiol.** 2001, n.281, p.H2310–H2317.

CHOWDHAR, Y. S. et al. Nitric oxide and cardiac muscarinic control in humans **Hypertension.** 2004, n.43, p.1023-1027.

CHOWDHARY, S.; TOWNEND, J. N. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. **Clin Sci.**, 1999, n.97, p.5–17.

CONLON, K.; KIDD, C. Neuronal nitric oxide facilitates vagal chronotropic and dromotropic actions on the heart. **J Auton Nerv Sys.** 1999, n.75, p.136–146.

CORBIN, J. D.; FRANCIS, S. H. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. **J Biol Chem.** 1999, May 14, v.274, n.20, p.13729-32.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Braz J Med Biol Res.** 2002, n.35, p.843-849.

DAS, A. et al. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. **J Biol Chem.** 2005, n.280, p.12944-12955.

ELVAN, A. et al. NO modulates autonomic effects on sinus discharge rate and AV nodal conduction in open-chest dogs. **Am J Physiol.** 1997, n.272, p.H263–H271.

FAZAN JR., R. et al. Modelos de hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.** 2001, n.8, p.19-29.

FERON, O. et al. Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate. **J Biol Chem.** 1998, n.273, p.30249–30254.

FERRARI, A. U. et al. Mechanisms of impaired parasympathetic control of the heart in hypertension: evidence against reduced cardiac vagal responsiveness. **J. Hypertens.** 1991, n.9 (Suppl.), p.S94-S95.

FERRARI, A. U. et al. Alterations in cardiac parasympathetic function in aged rats. **Am J Physiol.** 1991, n.260, p.H647-H649.

FERRARI, A. U. et al. Cardiac parasympathetic hyperresponsiveness in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 1992, n.19, p.653-657.

FERRARI, A. U. et al. Sympathovagal interplay in the control of overall blood pressure variability in unanesthetized rats. **Am J Physiol.** 1996, n.270, p. H2143-2148.

FISCHMEISTER, R. et al. Species-and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** 2005, n.142, p.136-143.

FU, M. et al. Properties of G-protein modulated receptor-adenylyl cyclase system in myocardium of spontaneously hypertensive rats treated with adriamycin. **Int J Cardiol.** 1994, n.44, p.9-18.

GANTEN, D.; JONG, W. In: HANDBOOK OF HYPERTENSION. **Elsevier Science,** 1994.

GROSS, G. J. Sildenafil and endothelial dysfunction in humans **Circulation**.2005, n.111, p.721-723.

HALCOX, J. P. et al. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. **J Am Coll Cardiol**. 2002, n.40, p.1232-1240.

HAN, X. et al. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node. **J Physiol**. 1998, n.509, p.741–754.

HEAD, G. A; ADAMS, M. A. Time course of changes in baroreceptor reflex control of heart rate in conscious SHR and WKY: contribution of the cardiac vagus and sympathetic nerves. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 1988, n.15. p.289-292.

HEAD, G.A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **J Auton Nerv Syst**. 1987, n.21, p.203-213.

HERRING, N.; PATERSON, D. J. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. **J Physiol**. 2001, n.535, p.507–518.

HOCKEL, G. M. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ. Res**. 1976, n.38 (Suppl 2), p.21-29.

HOFFMAN, B. B. Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. Seção II, Capítulo10, p.148-163. In: GILMAN, A. G. et al. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. São Paulo: McGraw-Hill Interamericana, 2003.

IRIGOYEN, M. C. et al. Aging and baroreflex control of RSNA and heart rate in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2000, n.279, p.R1865-R1871.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ. Res**. 1976, n.38 (Suppl 2), p.21-29.

JULIEN, C. et al. Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats. **J Auton Nerv Syst** 1995, n.50, p.239-252.

KAWADA, T. et al. Closed-loop identification of carotid sinus baroreflex transfer characteristics using electrical stimulation. **Jpn J Physiol**. 2000, n.50, p.371-380.

KLIMASCHEWSKI, L. et al. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. **Circ Res**. 1992, n.71, p.1533–1537.

KUKREJA, R. C. et al. Sildenafil-induced cardioprotection in rabbits. **Cardiovasc Res**. 2003, n.60, p.700-701.

KUO, T. B. J.; YANG, C. C. H. Altered frequency characteristic of central vasomotor control in SHR. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. 2000, n.278, p.H201-H207.

LI, M. et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. **Circulation**. 2004, n.109, p.120-124.

McCARTY, R. et al. Accelerated development of cardiac sympathetic responses in spontaneously hypertensive (SHR) rats. **Behav Neural Biol**. 1987, n.48, p.321-333.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, 1991, n.81, p.537-547.

MALPAS, S. C. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2002, n.282, p.H6-20.

MANCIA, G. et al. Interactions between sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**. 2nded. [S. l.]: Raven Press, 1995.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**. 1993,

n.268, p.12231-12234.

MASUDA, Y. Role of the parasympathetic nervous system and interaction with the sympathetic nervous system in the early phase of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2000, n.36 (Supp 2), p.S61-S64.

MINAMI, N.; HEAD, G. A. Cardiac vagal responsiveness during development in spontaneously hypertensive rats. **Autonom. Neurosci. Bas. Clin.** 2000, p.82, p.115-122.

MION JR. D. et al. Microneurography: technique to study cardiovascular regulation by the sympathetic nervous system in humans. **Rev Assoc Med Bras.** 1994, n.40, p.189-194.

MIYAMOTO, T. et al. High plasma norepinephrine attenuates the dynamic heart response to vagal stimulation. **Am. J. Physiol.** 2003, n.284, p.H241–H248.

MIYAMOTO, T. et al. Cardiac sympathetic nerve stimulation does not attenuate dynamic vagal control of heart rate via α -adrenergic mechanism. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 2004, n.287, p.H860-H865.

MOHAN, R. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. **Circ Res.** 2002, n.91, p.1089–1091.

MUSIALEK, P. et al. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I(f). **Circ Res.** 1997, p.81, p.60–68.

NAKAHARA, T. et al. Accumulation of camp augments dynamic vagal control of heart rate. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 1998, n.275, p.H562-H567.

NARAYANAN, N.; DERBY, J. A. Effects of age on muscarinic cholinergic receptors in rat myocardium. **Can J Physiol Pharmacol.** 1983, n.61, p.822-829.

OCKAILI, R. et al. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2002, n.283, p.H1263-H1269.

OKAMOTO. K.; AOKI. K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap. Cir. J.** 1963, n.27, p.282-293.

OKAMOTO, K. Development and course of studies on spontaneously hypertensive rats. **Saishin Igaku.** 1966, v.21, n.8, p.1878-1881.

PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympathovagal interaction in man and conscious dogs. **Circ.Res.** 1986, n.59, p.178-193.

PAGANI, M. et al. Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension. **Hypertension.** 1988, n.12, p.600-610.

PARATI, G. et al. Effects of aging on 24-h dynamic baroreceptor control of heart in ambulant subjects. **Am. J. Physiol.** 1995, n.268, p.H1606-H1612.

PHILLIPS, B. G. et al. Sympathetic activation by sildenafil. **Circulation.** 2000, n.102, p.3068-3073.

PICCIRILLO, G. et al. Effects of sildenafil citrate (viagra) on cardiac repolarization and on autonomic control in subjects with chronic heart failure. **Am Heart J.** 2002, n.143, p.703-710.

POTTER, E. K. Peripheral inhibition of the parasympathetic nervous system by angiotensin. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 1982, n.7 (Suppl.), p.51-55.

RAJA, S. G.; NAYAK, S. H. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. **Ann Thorac Surg.** 2004, n.78, p.1496-1506.

REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Therapeutic potential of phosphodiesterase 5 inhibition for cardiovascular disease. **Circulation.** 2003, n.108, p.239-244.

SANTELLLO, J. L. et al. Treatment of mild and moderate hypertension with diltiazem 240mg. Brazilian multicenter trial. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, 1996, n.66, p.365-369.

SCHALCHER, C. et al. Interaction of sildenafil with camp-mediated vasodilation in vivo. **Hypertension**. 2002, n.40, p.763-767.

SEARS, C. E. et al. Inhibition of nitric oxide synthase slows heart rate recovery from cholinergic activation. **J Appl Physiol**. 1998, n.84, p.1596–1603.

SOARES, P. P. et al. Effects of rat sinoaortic denervation on the vagal responsiveness and expression of muscarinic acetylcholine receptors. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2006, n.47, p.47:331-336.

SWYNGHEDAUW, B.; BAILLARD, C. Biology of hypertensive cardiopathy. **Curr Opin Cardiol**. 2000, n.5, p.247-253.

TAGAWA, T. et al. Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. **Circ Res**. 1994, n.75, p.70–76.

TRAVAGLI, R. A.; GILLIS, R. A. Nitric oxide-mediated excitatory effect on neurons of dorsal motor nucleus of vagus. **Am J Physiol**. 1994, n.266, p.G154–G160.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**. 1981, p.48, p.309-319.

TUCKER, D. C.; DOMINO, J. V. Balance among autonomic controls of heart rate in neonatal spontaneously hypertensive and borderline hypertensive rats. **J Auton Nerv Syst**. 1988, n.22, p.11-21.

TUCKER, D. C.; JOHNSON, A. K. Influence of neonatal handling on blood pressure, locomotor activity, and preweaning heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. **Development Psychobiol**. 1984, n.17, p.587-600.

VARAGIC, J.; FROHLICH, E. D. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension

and cardiac failure. **J Mol Cell Cardiol.** 2002, n.34, p.1435-1442.

VARDI, Y. et al. Effects of sildenafil citrate (viagra) on blood pressure in normotensive and hypertensive men. **Urology.** 2002, n.59, p.747-752.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rats (SHR) and of various spontaneous rat models and their implications. In: JONG, W. **Experimental and genetic models of hypertension.** Handbook of hypertension. [S. l.]: Elsevier Science, 1994.