ALEXANDRE JOSÉ TAVOLARI ARNOLD

**O papel do corpúsculo carotídeo na insuficiência
cardíaca induzida pela doxorubicina**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Profa. Dra. Elia Garcia
Caldini

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2017

ALEXANDRE JOSÉ TAVOLARI ARNOLD

**O papel do corpúsculo carotídeo na insuficiência
cardíaca induzida pela doxorrubicina**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Profa. Dra. Elia Garcia
Caldini

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arnold, Alexandre José Tavorari

O papel do corpúsculo carotídeo na insuficiência
cardíaca induzida pela doxorubicina / Alexandre
José Tavorari Arnold. -- São Paulo, 2017.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Tamaso Espin Farcia Caldini.

Descritores: 1.Corpo carotídeo 2.Células
quimiorreceptoras 3.Insuficiência cardíaca
4.Denervação 5.Doxorrubicina 6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-500/17

Preencha-se de si mesmo e o mundo caberá em suas mãos

Alexandre Arnold

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e aos amigos.

Dedico também aos heróis, muitas vezes não vistos, ouvidos ou sentidos: os animais.

Dedico ainda à Medicina Veterinária, profissão que virou estilo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, Aquele que me sustenta e abriu as portas certas para que eu chegasse onde estou.

Agradeço a minha família, base formadora do meu caráter e moral.

Agradeço a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela oportunidade de aprendizado quem me proporcionou.

Agradeço a Prof^ªDr^a. Elia TamasoEspin Garcia Caldini e a Prof^ªDr^a Maria Claudia Irigoyen por terem lutado arduamente por mim e por este título.

Agradeço a Isis Borges, Diogo Maués, Diana Ianonni e Camila Melo, alunos que me deram a oportunidade de ensiná-los. Com eles, aprendi muito; sem eles, este trabalho teria sido mais difícil.

Agradeço a todos do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração, por me situar neste mundo como um eterno aprendiz.

Agradeço pela vida de todos os animais utilizados neste estudo; sem eles, não teria obtido os conhecimentos que serão úteis para preservar a vida de outros.

Por fim, não menos importante, agradeço à Kika, minha parceira canina, que me acompanha na estrada da vida por 14 anos.

Meu mais sincero obrigado.

Lista de abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.2	Insuficiência Cardíaca - Definição e Classificação	4
1.3	INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO	7
1.4	DOXORRUBICINA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	10
1.5	O PAPEL DO CORPÚSCULO CAROTÍDEO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	12
2	HIPÓTESE	15
3	OBJETIVO	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	ANIMAIS E GRUPOS	16
4.2	DESNERVAÇÃO DO CORPÚSCULO CAROTÍDEO.....	17
4.3	INDUÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA PELA ADMINISTRAÇÃO DE DOXORRUBICINA	18
4.4	AVALIAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA PELO ECOCARDIOGRAMA	19
4.5	CANULAÇÃO PARA AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS	20
4.6	AVALIAÇÃO DO REFLEXO BARORRECEPTOR	21
4.7	MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL, INTERVALO DE PULSO, LABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL E DO INTERVALO DE PULSO	22
4.8	VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (ANÁLISE ESPECTRAL)	23
4.9	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS QUIMIORRECEPTORES .	24
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4.11	SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL	25

5	RESULTADOS	26
5.1	PESO CORPORAL NA INDUÇÃO DA IC.....	26
5.2	AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS	27
5.2.1	Pressão arterial	27
5.2.2	Frequência cardíaca	29
5.3	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA	30
5.3.1	Resposta Taquicárdica	30
5.3.2	Resposta Bradicárdica	31
5.4	AVALIAÇÃO QUIMIORREFLEXA	31
5.5	AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO E FREQUÊNCIA	33
5.5.1	Domínio do tempo	33
5.5.2	Domínio da frequência.....	36
5.6	CONTROLE AUTONÔMICO DA PRESSÃO ARTERIAL	42
5.7	AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACA	45
5.7.1	Volume na sístole	45
5.7.2	Volume na diástole	46
5.7.3	Diâmetro na sístole	47
5.7.4	Diâmetro na diástole	47
5.7.5	Septo na sístole	48
5.7.6	Septo na diástole	49
5.7.7	Parede posterior na sístole	49
5.7.8	Parede posterior na diástole	50
5.7.9	Aorta	51
5.7.10	Átrio Esquerdo	52
5.7.11	Aorta/Átrio Esquerdo	52
5.7.12	FAC	53
5.7.13	Fração de ejeção	54

5.7.14	E'/A'	55
5.7.15	E/E'	55
5.7.16	E/A	56
5.7.17	TRIV	57
5.8	PESO DOS ÓRGÃOS	58
5.8.1	Coração e ventrículo esquerdo	58
5.8.2	Pulmão	60
5.9	MORTALIDADE	60
5.7.17	DISCUSSÃO	62
6.1	PESO CORPORAL	62
6.2	HEMODINÂMICA.....	63
6.3	SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	65
6.4	QUIMIORREFLEXO	67
6.5	CONTROLE AUTONÔMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO E DA FREQUÊNCIA	69
6.6	CONTROLE AUTONÔMICO DA PRESSÃO ARTERIAL	71
6.7	AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACA	72
6.8	PESO DOS ÓRGÃOS	74
6.9	MORTALIDADE	75
7	CONCLUSÃO.....	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCF	Fundação de Colégio Americano de Cardiologia
AE	Análise Espectral
AHA	Associação Americana de Cardiologia
AngII	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
CC	Corpúsculos Carotídeos
CDOX	Grupo Controle + Doxorubicina
CSAL	Grupo Controle + Solução salina
DC	Débito Cardíaco
DDOX	Grupo Desnervado + Doxorubicina
DI	Doenças Isquêmicas
DP	Desvio padrão
DOX	Doxorubicina
DSAL	Grupo Desnervado + Solução salina
EF	Estudo de Framingham
ESC	Sociedade Europeia de Cardiologia
FC	Frequência Cardíaca
FCI	Frequência Cardíaca Intrínseca
FE	Fração de Ejeção
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
GMO cíclico	Guanosina Monofosfato
HÁ	Hipertensão Arterial
HF	Alta Frequência
HS	Hiperatividade Simpática
IC	Insuficiência Cardíaca
ICFEP	Fração de Ejeção Preservada
ICFER	Fração de Ejeção Reduzida
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IM	Infarto do Miocárdio
InCor/FMUSP	Instituto do Coração – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IP	Intervalo de Pulso
ITR	Índice de Taquicardia Reflexa
IBR	Índice de Bradicardia Reflexa
KCN	Cianeto de Potássio
LF	Baixa Frequência
NIH	National Institute of Health, dos EUA
NYAH	Associação Cardíaca de Nova York
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
R	Regulares
RMSSD	Raiz Quadrada das Diferenças entre Intervalos RR
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RP	Resistência Periférica
RVLB	Rostro Vento Lateral do Bulbo
SBR	Sensibilidade Barorreflexa
SC	Sistema Cardiovascular
SDNN	Desvio Padrão dos Intervalos RR
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
VE	Ventrículo Esquerdo
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VIM	Via Intramuscular
VLF	Ultrabaixa Frequência

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparação das classificações de IC, imagem retirada do Guia para diagnóstico e tratamento da falha cardíaca aguda e crônica da ESC	6
Tabela 2	VFC no domínio do tempo dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX)	44
Tabela 3	VFC e da PA dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX)	45
Tabela 4	Avaliação morfofuncional cardíaca dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX)	58

Lista de Figuras

Figura 1	Inervação do corpo carotídeo e dos barorreceptores carotídeos da bifurcação da carótida	18
Figura 2	Administração de doxorrubicina pela via intraperitoneal	19
Figura 3	Aparelho de ecocardiograma	19
Figura 4	Esquema da canulação	20
Figura 5	Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas	22
Figura 6	Resposta quimiorreflexa a administração de KCN	24
Figura 7	Sequência Experimental	25
Figura 8	Valores de Média e erro padrão da média dos valores de peso corporal no início do protocolo	26
Figura 9	Valores de Média e erro padrão da média dos valores de peso corporal ao final do período experimental	27
Figura 10	Valores de Média e erro padrão da média Pressão arterial sistólica	28
Figura 11	Valores de Média e erro padrão da média para Pressão arterial média	28
Figura 12	Valores de média e erro padrão da média para Pressão arterial diastólica	29
Figura 13	Valores de média e erro padrão da média para Frequência cardíaca	30
Figura 14	Valores de média e erro padrão da média para Resposta taquicárdica às reduções induzidas da PAS	30
Figura 15	Valores de média e erro padrão da media para a Resposta bradicárdica. às reduções induzidas da PAS	31
Figura 16	Valores de média e erro padrão da média para a Resposta Quimiorreflexa 60ug/kg de KCN	32
Figura 17	Valores de média e erro padrão da média para a Resposta Quimiorreflexa 100ug/kg de KCN	33
Figura 18	Valores de média e erro padrão da média para Intervalo de Pulso	34
Figura 19	Valores de médio e erro padrão da média para intervalo de pulso	34
Figura 20	Valores de media e erro padrão da média para variância do intervalo de pulso	35
Figura 21	Valores de média e erro padrão da média para RMSSD	36
Figura 22	Valores de média e erro padrão da média para VLF Abs.....	36
Figura 23	Valores de média e erro padrão da média para LFA	37

	bs.....	
Figura 24	Valores de média e erro padrão da média para HF Abs	38
Figura 25	Valores de média e erro padrão da média para VLF%	38
Figura 26	Valores de média e erro padrão da média para LF%.	39
Figura 27	Valores de média e erro padrão da média para HF%	40
Figura 28	Valores de média e erro padrão da média para LF(nu).....	40
Figura 29	HF(nu). ANOVA	41
Figura 30	Valores de média e erro padrão da média para LF/HF. ANOVA	42
Figura 31	Valores de média e erro padrão da média para PAS.....	42
Figura 32	Valores de média e erro padrão da média para Desvio padrão da PAS	43
Figura33	Valores de média e erro padrão da média para Variância da PAS.....	44
Figura 34	Valores de média e erro padrão da média para LF da PAS	44
Figura 35	Valores de média e erro padrão da média para Volume na sístole	46
Figura 36	Valores de média e erro padrão da média para Volume na diástole	46
Figura 37	Valores de média e erro padrão da média para Diâmetro na sístole	47
Figura 38	Valores de média e erro padrão da média para Diâmetro na diástole	48
Figura 39	Valores de média e erro padrão da média para Septo na sístole	49
Figura 40	Valores de média e erro padrão da média para Septo na diástole	49
Figura 41	Valores de média e erro padrão da média para Parede posterior na sístole	50
Figura 42	Valores de média e erro padrão da média para Parede posterior na diástole	51
Figura 43	Valores de média e erro padrão da média para Aorta.....	51
Figura 44	Valores de média e erro padrão da média para Átrio esquerdo	52
Figura 45	Valores de média e erro padrão da média para Aorta/Átrio esquerdo	53
Figura 46	Valores de média e erro padrão da média para FAC.....	54
Figura 47	Valores de média e erro padrão da média para Fração de Ejeção	54
Figura 48	Valores de média e erro padrão da média para E'/A'.....	55
Figura 49	Valores de média e erro padrão da média para E/E.....	56
Figura 50	Valores de média e erro padrão da média para E/A	56
Figura 51	Valores de média e erro padrão da média para TRIV	57
Figura 52	Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do	

	coração	59
Figura 53	Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do ventrículo	59
Figura 54	Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do pulmão	60
Figura 55	Curva de mortalidade de Kaplan-Meier	61

RESUMO

Arnold AJT. *O papel do corpúsculo carotídeo na insuficiência cardíaca induzida pela doxorubicina* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A insuficiência cardíaca (IC) é o estágio final de diversas patologias cardíacas e apresenta alta morbimortalidade. Dentre as causas, estão os efeitos cardiotoxícos em pacientes tratados com doxorubicina (Dox). A fisiopatologia da IC apresenta aumento da atividade barorreflexa e marcada hiperatividade simpática (HS), estado compensatório à redução do débito cardíaco. Porém, a HS prolongada culmina em alterações deletérias para o sistema cardiovascular (SC) com piora do quadro de sintomas. Atualmente muito se discute sobre o papel dos corpúsculos carotídeos (CC) na fisiopatologia da IC devido ao seu reflexo simpatotônico e a melhora de pacientes portadores de IC após a remoção dos CC. O nosso objetivo foi avaliar a influência do CC na evolução da IC induzida pela DOX. Para tal, 35 ratos Wistar machos foram dispostos em 4 grupos: controle Salina (CSAL; n=7) e Controle Dox (CDOX; n=12), Desnervado Salina (DSAL; n=4) e Desnervado Doxo (DDOX; n=12). A desnervação consistiu na ressecção do nervo sinusal bilateral prévia à administração de Dox; a indução da IC ocorreu através de 6 aplicações de Dox, na dose de 2.5mg/kg, pela via IP a cada 4 dias. Após 15 dias do término da indução, os animais foram avaliados pelo ecocardiograma e canulados para registro de pressão arterial invasiva e avaliação hemodinâmica, autonômica, barorreflexa e quimiorreflexa. A análise dos resultados mostra que o grupo CDOX apresentou redução do peso corporal, da sensibilidade baro e quimiorreflexa, hiperatividade simpática acompanhada de redução vagal, redução da morfologia cardíaca associada à disfunção diastólica e sistólica e redução do peso bruto cardíaco e ventricular. A desnervação não foi capaz de reverter os efeitos deletérios causados pela Dox, inclusive a desnervação acentuou a disfunção diastólica e sistólica induzida pela Dox. Concluiu-se que a desnervação carotídea não foi eficiente em melhorar a insuficiência cardíaca induzida pela Dox no modelo experimental proposto.

Descritores: corpo carotídeo; células quimiorreceptoras; insuficiência cardíaca; denervação; doxorubicina; ratos Wistar

ABSTRACT

Arnold AJT. *The role of the carotid corpuscle in heart failure induced by doxorubicin* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Heart failure (HF) is the final stage of several cardiac pathologies and results in high morbimortality. Among the causes, we can mention the cardiotoxic effects in patients treated with doxorubicin (Dox). The pathophysiology of HF has increased baroreflex activity and marked sympathetic hyperactivity (HS), a compensatory state to the reduction of cardiac output. However, prolonged HS results in worsening of the symptoms. Currently, the role of carotid corpuscles (CC) in the pathophysiology of HF is discussed due improvement of sympathetic reflex presents in patients with HF after CC removal. The objective of this study was to evaluate the influence of CC on the evolution of HF induced by DOX for this method 35 Male Wistar rats arranged in 4 groups: Salina control (CSAL; n = 7) and Dox Control (CDOX; n = 12) Salina Denervated (DSAL; n = 4) and Dox Denervated (DDOX; n = 12). A denervation consisted of bilateral sinus nerve resection prior to Dox administration, induction of HF through 6 Dox applications at a dose of 2.5mg / kg, via IP every 4 days. After 15 days of the end of the induction, the animals were evaluated by echocardiogram and cannulated to record invasive blood pressure and hemodynamic, autonomic, baroreflex and chemoreflex evaluation. Our experiment demonstrated that the CDOX group had reduction of body weight, baro and chemoreflex sensitivity, sympathetic hyperactivity accompanied by vagal reduction, reduction of cardiac morphology associated with diastolic and systolic dysfunction and reduction of gross cardiac and ventricular weight. The denervation is not able to reverse the deleterious effects caused by Dox, including denervation accentuated by Dox-induced diastolic and systolic dysfunction. Based on our results on a carotid denervation it was not effective in improving heart failure induced by Dox.

Descriptors: carotid body; chemoreceptor cells; heart failure; denervation; doxorubicin; rats, Wistar

1. INTRODUÇÃO

1.1 – INSUFICIÊNCIA CARDÍACA – HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

A insuficiência cardíaca (IC) não é uma síndrome recente na história do homem. Relatos desta condição clínica existem desde o antigo Egito, Grécia, Índia e Roma (DAVIS et al., 2000). Dentro da historicidade da doença, os romanos ficaram conhecidos por tratarem a IC através da planta *foxglove* ou dedaleira, cientificamente chamada de *Digitalis purpúrea L*, por conter a toxina digitalina que é base para o desenvolvimento de fármacos digitálicos que apresentam ação inotrópica positiva (BAGRIV et al. 2009).

A compreensão da IC começa em 1628 quando William Harvey consegue descrever a circulação sanguínea e continua quase dois séculos depois quando as pesquisas sobre as cardiomiopatias e IC foram reforçadas e refinadas através da criação de equipamentos como estetoscópio, eletrocardiograma, raios-X e ecocardiograma, juntamente com práticas terapêuticas a base de digitálicos, diuréticos, e inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) (DAVIS et al., 2000). Ainda no século XX, surgiram os primeiros estudos epidemiológicos que reforçaram a compreensão da fisiopatologia da IC através da elucidação de fatores que estão relacionados a sua patogênese (HO et al., 1993).

A epidemiologia da IC parece contribuir muito no conhecimento e manejo da doença desde a pesquisa de Kalon Ho e colaboradores (1993), que delineou os agentes etiológicos e fatores de riscos que se mantém presentes até os dias atuais. Esta investigação ficou conhecida como “Estudo de Framingham” (“EF”) e consistiu em uma pesquisa de coorte, observacional e prospectiva que acompanhou por quarenta anos, de 1948 a 1988, os residentes de uma pequena região do Massachusetts chamada de Framingham. O estudo envolveu 9405 participantes de 6 a 70 anos de idade, homens, mulheres e crianças,

separados em grupos com e sem doenças cardiovasculares como hipertensão e/ou doença arteriosclerótica (HO *et al.*, 1993).

A conclusão do “EF” aponta para número elevado de indivíduos que desenvolveram IC; dentre os mais acometidos estão os homens idosos a partir dos 60 anos de idade com prevalência de 66/1000 e incidência de 78/1000. A hipertensão arterial (HA) e as coronariopatias foram consideradas como os principais agentes etiológicos, principalmente quando ambas estão presentes. Outras causas também foram listadas como diabetes, hipercolesterolemia e tabagismo, porém com menor impacto. Concomitante à prevalência e incidência, a mortalidade também foi alta: nos primeiros três meses após a descoberta da síndrome; a mortalidade alcançou valores aproximados de 27%, para homens e mulheres, e, após cinco anos, a mortalidade subiu para 75% nos homens e 44% nas mulheres (HO *et al.*, 1993).

Mais recentemente, a Sociedade Europeia de Cardiologia (ECSAL) em 2008, a Fundação de Colégio Americano de Cardiologia (ACCF) em parceria com a Associação Americana de Cardiologia (AHA) em 2013 e a AHA, em 2015, publicaram guias de tratamentos, diagnóstico e atualizações estatísticas sobre a IC na Europa e Estados Unidos da América. Estes dados ainda hoje são similares aos obtidos no “EF”, relatando a alta prevalência e incidência, assim como, o aumento das mesmas com relação à idade alcançando até 20% dos atendidos entre 70 e 80 anos de vida, com discreta diferença entre os gêneros (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.* 2013; MOZAFFARIAN *et al.*, 2015).

Dentre as etiologias citadas nos três estudos a HA e as coronariopatias e estão em destaque. Novas causas são citadas como endocrinopatias, medicamentosas, toxinas e outros (YANCY *et al.* 2013). A mortalidade, de forma similar, também permanece alta em todos os estudos, atingindo 40% dos pacientes no primeiro ano após a admissão hospitalar e aumentando para 50% em até quatro anos (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.*, 2013;

MOZAFFARIAN *et al.*, 2015). Os custos atuais com o diagnóstico e tratamento são consideráveis; em 2013, nos EUA, a IC representou 5% das internações hospitalares agudas e 10% dos leitos ocupados em hospitais, alcançando gastos de U\$30 bilhões e estima-se que até 2030 os gastos aumentarão para U\$69 bilhões devido a um aumento esperado de 46% de pacientes com IC (YANCY *et al.*, 2013; MOZAFFARIAN *et al.*, 2015).

Apesar de existirem poucos estudos epidemiológicos no Brasil sobre o assunto, informações relevantes para o entendimento da IC no nosso país surgiram a partir de 2001 com a descrição, ainda que sem dados de prevalência e incidência, do aumento da frequência da IC com o aumento da idade e as hospitalizações decorrentes desta síndrome foram aproximadamente de 52% em homens e mulheres entre 60 e 80 anos de idade (LESSA., 2001).

Recentemente, Albuquerque e colaboradores (2015) conseguiram atualizar os dados sobre a IC no Brasil. As duas grandes causas listadas são a HA e as doenças isquêmicas (DI). Outras causas são listadas como a cardiomiopatia dilatada, a doença valvar, a doença de chagas, a miocardite secundária a quimioterápicos, porém com menor relevância. Esta investigação salienta que a IC no Brasil ainda continua atingindo os mais idosos, pois 73% dos pacientes atendidos tinham mais de 75 anos e 60% eram mulheres. Traçando um comparativo da região com a idade e etiologia, o estudo permite concluir que as pessoas idosas são mais acometidas no Sul por DI, assim como, os mais jovens no Norte pela HA. A mortalidade no Brasil mantém alta nos primeiros dias de internação alcançando 12,3% dos pacientes atendidos. Dentre as diversas causas que contribuíram para mortalidade as principais foram infecções, pouca adesão ao tratamento medicamentoso e aumento da ingestão de sódio e água (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015).

Sem a menor sombra de dúvida, os estudos epidemiológicos ajudaram a delinear os fatores mais implicados no desenvolvimento da IC e, desta forma, guiaram as pesquisas para

descoberta de informações sobre a doença em si, a sua própria definição, classificação e a sua relação com outros sistemas do organismo, entre eles, a relação da IC com o sistema nervoso autônomo (SNA), objeto de interesse deste trabalho.

1.2 – INSUFICIÊNCIA CARDÍACA - DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

A IC é o estágio final de diversas patologias cardíacas, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade nos EUA, Europa e Brasil (FELKER *et al.*, 2006; DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.*, 2013). Devido à complexidade desta síndrome houve diversas tentativas para sua definição. Entre 1933 e 1995 a literatura descreve pelo menos nove definições distintas sobre a condição patológica que resulta na insuficiência do coração. Destas definições, a aceita por mais tempo foi feita em 1995 pela *The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology* que segue pela somatória de sintomas e evidências objetivas de insuficiência cardíaca aliada a resposta ao tratamento dirigido à insuficiência cardíaca (DAVIS *et al.*, 2000).

Entretanto no ano de 2008 a ESC definiu a IC como uma síndrome clínica em pacientes que apresentam sinais e sintomas clássicos da doença, associados a alterações anatômicas e funcionais do coração (DICKSTEIN *et al.*, 2008). Em contraste a definição da ESC, a AHA/ACCF e outros pesquisadores, chegaram ao consenso que a definição fisiopatológica da IC é uma síndrome complexa resultante de qualquer alteração estrutural e/ou funcional que impede o coração de realizar o adequado preenchimento e ejeção do sangue (DUSCHA *et al.*, 2008; BAX *et al.*, 2011; YANCY *et al.* 2013; ROY *et al.*, 2014).

O quadro de IC pode se manifestar de diversas formas, desde a ausência de sinais clínicos com discretos sintomas até a formação dos quadros clássicos que envolvem fadiga, dispnéia, intolerância ao exercício, congestão esplâncnica e retenção de líquidos que podem resultar em edema pulmonar, periférico até anasarca. Um dos motivos para IC apresentar

variações na sua manifestação clínica deve-se ao fato da doença não ser exclusivamente o reflexo de cardiomiopatias ou disfunções do ventrículo esquerdo (VE). De fato, estas causas podem predispor à síndrome, porém a IC também está associada a uma variação enorme nos pacientes com diversas anormalidades funcionais com os diversos tamanhos do VE, desde aqueles com tamanho normal com fração de ejeção (FE) preservada até aqueles com severa dilatação cardíaca e marcada diminuição da FE (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.* 2013).

Frente à diversidade de situações envolvendo a IC, a FE é usada como referência para separar os pacientes que apresentam IC com fração de ejeção preservada (ICFEP) daqueles que apresentam fração de ejeção reduzida (ICFER) (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.* 2013). Em grande parte, a ICFER tem suas principais causas predisponentes nas doenças coronarianas associadas ao infarto do miocárdio. As alterações decorrentes do funcionamento cardíaco refletem-se na fração de ejeção com valores menores ou iguais a 40%, mesmo em pacientes que recebem medicação eficaz para o tratamento da IC, sendo que, comumente, estão presentes disfunções diastólicas e sistólicas (ROCCA *et al.* 1999; DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.* 2013).

As pesquisas sobre IC culminaram em várias formas de classificar a doença e atualmente duas são as mais utilizadas: a primeira elaborada pela AHA em parceria com a ACCF e a segunda pela Associação Cardíaca de Nova York (NYAH). **A tabela 1** permite a comparação entre as duas formas de classificação da IC.

Tabela 1 – Comparação das classificações de IC, imagem retirada do *Guia para diagnóstico e tratamento da falha cardíaca aguda e crônica da ESC – 2008*.

ACC/AHA stages of heart failure		NYHA functional classification	
Stage of heart failure based on structure and damage to heart muscle		Severity based on symptoms and physical activity	
Stage A	At high risk for developing heart failure. No identified structural or functional abnormality; no signs or symptoms.	Class I	No limitation of physical activity. Ordinary physical activity does not cause undue fatigue, palpitation, or dyspnoea.
Stage B	Developed structural heart disease that is strongly associated with the development of heart failure, but without signs or symptoms.	Class II	Slight limitation of physical activity. Comfortable at rest, but ordinary physical activity results in fatigue, palpitation, or dyspnoea.
Stage C	Symptomatic heart failure associated with underlying structural heart disease.	Class III	Marked limitation of physical activity. Comfortable at rest, but less than ordinary activity results in fatigue, palpitation, or dyspnoea.
Stage D	Advanced structural heart disease and marked symptoms of heart failure at rest despite maximal medical therapy.	Class IV	Unable to carry on any physical activity without discomfort. Symptoms at rest. If any physical activity is undertaken, discomfort is increased.

A classificação da AHA/ACCF considera o grau de IC de acordo com as anormalidades estruturais. A primeira fase, **estágio A**, compreende os pacientes que não apresentam qualquer anormalidade estrutural cardíaca, assim como, sintomas e sinais clínicos, porém estão em um grupo de risco para desenvolvimento da doença. Já a forma mais grave da doença, **estágio D**, inclui os pacientes que apresentam doença estrutural cardíaca avançada, sintomas acentuados em repouso e terapia medicamentosa máxima (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.*, 2013).

A Classificação feita pela NYAH leva em consideração a severidade da doença baseada nos sintomas e a capacidade de desempenhar atividade física, desde a forma branda da doença, **classe I**, que representa o grupo de pessoas que não apresentam limitações nas atividades físicas, concomitante à ausência de sintomas como fadiga, palpitação e dispnéia, até a forma mais severa da IC, **classe IV**, que agrupa pacientes com incapacidade de realizar

qualquer atividade física sem causar desconforto além da presença de sintomas em repouso (DICKSTEIN *et al.*, 2008; YANCY *et al.* 2013).

1.3 – INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

O sistema nervoso autônomo é constituído pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo sistema nervoso parassimpático (SNP). A homeostase cardíaca é dependente da forma como ambos os sistemas atuam. O SNS atua através da liberação de noradrenalina no sistema cardiovascular com aumento da frequência cardíaca, da contração ventricular e da condutividade atrioventricular, assim como na resistência periférica. Contrapondo o SNS, o SNP apresenta ação inibitória devido à liberação de acetilcolina no sistema cardiovascular causando diminuição da frequência cardíaca, da contração ventricular e aumento da capacitância venosa. A atuação do SNS e SNP ocorre frente às diversas situações fisiológicas ou fisiopatológicas com o intuito de ajustar o débito cardíaco (DC) e resistência periférica (RP) para manter estável a pressão arterial (PA) (DE ANGELIS, 2004; TRIPOSKIADIS *et al.*, 2009).

A percepção e o controle da PA pelo SNA ocorrem por meio de grandes arcos reflexos ligados aos receptores cardiopulmonares, pressoreceptores e quimiorreceptores arteriais. Os receptores cardiopulmonares estão presentes no coração e atuam na percepção da pressão das câmaras ventriculares induzindo respostas na frequência cardíaca, vasculatura muscular esquelética, resistência renal e débito urinário (DE ANGELIS, 2004). Os quimiorreceptores arteriais atuam na regulação do pH sanguíneo através da sensibilidade de PO_2 e PCO_2 ; quando o pH cai abaixo dos valores fisiológicos, seja por diminuição do PO_2 e/ou aumento do PCO_2 , os quimiorreceptores enviam mensagens ao centro de integração no bulbo cerebral resultando em uma resposta eferente simpática que aumenta a

frequência respiratória na tentativa de normalizar o pH (IRIGOYEN *et al.*, 2001; DE ANGELIS, 2004).

Os barorreceptores apresentam importante papel no controle da PA momento a momento. Também conhecidos como mecanorreceptores, estes são terminações nervosas livres que se localizam na adventícia de grandes vasos como arco aórtico e seio carotídeo sendo estimuladas por deformações nas paredes dos referidos vasos, oriundas da onda de pressão provocada pelas sístoles ventriculares. Assim sendo, a atuação dos barorreceptores dá pela percepção da deformidade do vaso caso a PA se altere saindo dos valores basais. De forma similar aos quimiorreceptores, os barorreceptores enviam sinais para o bulbo, no núcleo do trato solitário, que por sua vez estimulará ou inibirá a inervação parassimpática e/ou simpática no coração e vasos, resultando no retorno aos níveis basais da pressão arterial (IRIGOYEN *et al.*, 2001).

Uma das formas utilizadas para avaliar a ação do SNA frente às diversas patologias é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), representada pelos intervalos de batimentos cardíacos regulares (R) no domínio do tempo e da frequência. No domínio do tempo, a VFC permite avaliar a atividade vagal através de índices estatísticos como o Desvio Padrão dos Intervalos RR (SDNN) e a Raiz Quadrada das Diferenças entre Intervalos RR normais e adjacentes (RMSSD). No domínio da frequência, é utilizada a análise espectral (AE) da VFC. A AE separa os batimentos cardíacos em componentes de alta, baixa e ultrabaixa frequência. A alta frequência (HF) representa a modulação respiratória e atuação do nervo vago sobre o coração, em quanto que a baixa frequência (LF) é dependente dos componentes vagal e simpático no coração, com predomínio do simpático. Por fim, a ultrabaixa frequência (VLF) parece estar relacionada ao sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), à termorregulação e ao tônus vasomotor (VANDERLEI *et al.*, 2009).

O SNA é um dos sistemas acometidos em diversas condições patológicas como a HA, infarto do miocárdio (IM), diabetes e IC. Especificamente na IC, a redução do débito cardíaco leva à estimulação de muitos reflexos cardiovasculares como os mediados pelos barorreceptores, pelos quimiorreceptores e pelo SRAA, culminando na estimulação do SNS, redução da atividade vagal, aumento das catecolaminas circulantes e estresse oxidativo (KOBAYASHI *et al.*, 2013; FLORAS, 2009; ROY *et al.*, 2014; CHATTERJEE & SINGH, 2015).

O aumento do tônus simpático ocorre inicialmente para compensar o quadro de IC devido à queda do débito cardíaco. Esta ativação inicialmente é compensatória, porém em longo prazo, a exacerbação do tônus simpático promove remodelamento cardiovascular e consequentemente leva a prognóstico ruim. Entretanto, estudos apontam que pacientes com IC-FEP também apresentam aumento da atividade simpática (FLORAS, 2009). Além da marcada atividade simpática, a IC é acompanhada de redução da atividade parassimpática. Esta relação é observada nos quadros iniciais de remodelamento cardíaco que poderá resultar na IC (KINUGAWA & DIBNER-DUNLAP, 1995; KISHI & HIROOKA, 2012).

Levando em consideração que o controle do sistema cardiovascular pelo SNA ocorre por meio de arco reflexos, a disautonomia pela IC pode ser desencadeada por alterações nos receptores periféricos e/ou no sistema nervoso central (SNC). Estudos sugerem que a hiperatividade simpática de origem central é decorrente da ativação local do SRAA no cérebro, ocasionando a produção e liberação de angiotensina II (AngII) que ao entrar em contato com receptores AT1 na região rostroventro lateral do bulbo (RVLB), responsável pela atividade vasomotora, ocasiona excitação simpática. Outro produto da ativação do SRAA é a produção de componentes oxidativos que também culminam na excitação da região RVLB (KINUGAWA & DIBNER-DUNLAP, 1995; KISHI *et al.*, 2004; KISHI & HIROOKA, 2012).

Igualmente aos mecanismos centrais responsáveis pela disautonomia, os receptores periféricos de controle da pressão arterial, como barorreceptores e quimiorreceptores, colaboram para a hiperatividade simpática na IC. Notoriamente a sensibilidade barorreflexa (SBR) está diminuída na IC pela disfunção dos barorreceptores, devido à ação da AngII e pela baixa resposta do nodo sinusal; outras patologias prévias podem afetar a SBR, entre elas as mais prevalentes são a HA e coronariopatias (LOPES *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2004). Os mesmos achados também podem ser evidenciados nos animais pelo aumento da sobrevivência de ratos infartados com a SBR preservada quando comparados aos animais infartados submetidos à desnervação sino aórtica (MOSTARDA *et al.*, 2010).

1.4 – DOXORRUBICINA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A Doxorubicina (Dox), uma conhecida antraciclina, é um fármaco antineoplásico altamente eficaz utilizado no tratamento de uma variedade de neoplasias. Apesar de sua eficácia, os efeitos secundários cardiotoxicos são irreversíveis e dose dependente, levando a uma grande preocupação com o uso da droga (SPALLAROSSA *et al.* 2006; LUDKE *et al.* 2009). Embora vários mecanismos estejam envolvidos na insuficiência cardíaca induzida pela Dox, sabe-se que aumento do estresse oxidativo cardíaco pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução nas defesas antioxidantes estão entre as mais estudadas causas subjacentes associadas à indução de cardiomiopatia (SINGAL & ILISKOVIC, 1998).

O estresse oxidativo provoca aumento da toxicidade em cardiomiócitos, danos irreversíveis no DNA e alteração do metabolismo energético cardíaco levando a apoptose dos cardiomiócitos (OCTAVIA *et al.*, 2012). Vários outros mecanismos como a lesão inflamatória, sobrecarga de cálcio e a hiperatividade simpática parecem também estar

envolvidos levando, ao final, à disfunção sistólica (DOROSHOW, 1983; TONG *et al.*, 1991). Em relação à hiperatividade simpática, um dos mecanismos possíveis seria o controle barorreflexo do coração. De fato, existem evidências que coelhos tratados com DOX, em presença de disfunção sistólica esquerda apresentam perturbações desse mecanismo de controle da circulação (SANO *et al.*, 1990).

Além disso, quanto ao desenvolvimento do processo de insuficiência cardíaca por DOX, nosso grupo demonstrou que apesar de não ter sido detectada alteração do débito cardíaco ou do controle reflexo da frequência cardíaca comandado pelos pressoreceptores, a disfunção diastólica estava presente após tratamento com uma dose total de 13 mg/kg, divididos em 6 aplicações administradas em dias alternados (RABELO *et al.*, 2001). De forma interessante, neste experimento, foi possível detectar um aumento do estresse oxidativo (por quimiluminescência) inversamente associado à sensibilidade do barorreflexo, ainda que não tenha havido, na média, prejuízo desse sistema de controle da PA (RABELO *et al.*, 2001).

Provavelmente à medida que o processo de IC se instalava, o controle autonômico da circulação se deteriorava, não sendo possível por esses dados, estabelecer uma relação de causa e efeito. Parece, portanto, evidente, que antes do desenvolvimento de disfunção sistólica, se instala claramente a insuficiência diastólica acompanhada de aumento do estresse oxidativo e de redução no controle barorreflexo da circulação (RABELO *et al.*, 2001).

A Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia, de 2011, define cardiotoxicidade com base nas medidas da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) (PATON *et al.*, 2013). Mesmo o NIH (National Institute of Health, dos EUA) define cardiotoxicidade segundo a FEVE: Grau I: redução assintomática da FEVE entre 10% e 20%; Grau II: redução da FEVE abaixo de 20% ou abaixo do Normal e Grau

III: insuficiência cardíaca sintomática. Em todas as circunstâncias existe prejuízo da função miocárdica e é nesse sentido que a maioria do manejo desses casos tem se embasado (SEBER *et al.*, 2013).

Sabe-se, por exemplo, que o uso profilático de carvedilol pode prevenir a cardiomiopatia induzida pelas antraciclinas embora estudos clínicos testando a eficácia de carvedilol ainda sejam escassos (ARZAL *et al.*, 2010). O uso de betabloqueadores também tem sido avaliado: em uma coorte de 201 pacientes com miocardiopatia por antraciclinas evidenciou de maneira clara que quanto mais precoce o início da terapêutica (IECA e betabloqueadores) maior o sucesso da recuperação da função ventricular (CARDINALE *et al.*, 2010). Dessa forma, parece que o manejo dos principais mecanismos envolvidos na disfunção miocárdica induzida pela DOX e outras antraciclinas, como a hiperatividade simpática e o estresse oxidativo, tem contribuído para a manutenção da função ventricular dentro dos limites de normalidade nesse grupo.

1.5 – O PAPEL DO CORPÚSCULO CAROTÍDEO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Os corpúsculos carotídeos (CC) estão localizados na bifurcação da carótida comum para as carótidas internas e externas. Histologicamente é formado basicamente por vasos sanguíneos e células chamadas de glomus tipo I, responsáveis pela sensibilidade do pH e do tipo II que atuam na sustentação das células do tipo I; a sua comunicação com o SNC ocorre exclusivamente através de um nervo aferente chamado de nervo sinusal ou de Hering. Os corpúsculos carotídeos apresentam diversas funções entre elas à regulação do pH sanguíneo através dos índices de PO₂ e do PCO₂ percebidos pelas células do tipo I que, além disso, podem também ser sensíveis aos mediadores da inflamação na circulação (GUIMARÃES *et al.*, 2011; KUMAR & PRABHAKAR, 2012).

A regulação do pH sanguíneo ocorre quando o CC percebe a queda dos níveis de PO_2 e/ou o aumento do PCO_2 gerando um estímulo aferente que será transmitido, inicialmente pelo nervo sinusal, até o centro de integração no bulbo. O processamento no bulbo resulta na estimulação simpática eferente ocasionando o aumento frequência respiratória, a correção os níveis de PO_2 e PCO_2 e, finalmente, do pH. Nos pacientes portadores de IC a ativação dos CC pode ser notada pelo aumento da frequência respiratória. Deve ser lembrado também que à medida que a pressão parcial de oxigênio cai (ou a de CO_2 aumenta) existe um aumento proporcional da resistência periférica total, garantindo um aumento da pressão de perfusão e a homeostase dos tecidos e células (KUMAR & PRABHAKAR, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013). Os processos implicados na estimulação do CC não foram completamente elucidados, sendo a diminuição da perfusão tecidual uma das possíveis razões; a primeira causa de hipoperfusão tecidual está relacionada à queda do débito cardíaco causando vasoconstrição periférica que é potencializada pela ação local da AngII e pela diminuição dos níveis de óxido nítrico e pelo aumento dos mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF α , comuns na IC (LI *et al.*, 2006; DING *et al.*, 2011).

A importância do CC na progressão do quadro de IC ganha destaque quando pesquisas clínicas apontaram o aumento na mortalidade em pacientes internados por IC e que apresentavam maior atividade carotídea. Estes resultados clínicos reportados podem ser reproduzidos experimentalmente. Coelhos com IC induzidos por implante de marca passo apresentaram melhora do quadro clínico, da função cardíaca, diminuição do processo inflamatório no coração e menor mortalidade quando submetidos a remoção unilateral dos CC após a instalação da IC. Os mesmos resultados foram obtidos em ratos submetidos previamente à desnervação ou remoção dos CC e posteriormente induzidos experimentalmente à IC pelos métodos de coarctação da aorta (LI *et al.*, 2006; PATON *et al.*, 2013; DEL RIO *et al.*, 2015).

Notoriamente, o quadro de IC causa um desbalanço autonômico devido a hiperatividade simpática, que pode também ser mediada pela influência dos CC. O seu efeito tônico simpático quando exacerbadamente ativado pode contribuir para o quadro de ativação neuro humoral da IC. Estudos experimentais em ratos espontaneamente hipertensos mostraram a participação do tônus simpático oriundo do CC na manutenção da pressão arterial; nestes mesmos animais, após a instalação da hipertensão, observou-se redução considerável da pressão arterial média após cinco dias da desnervação do CC (ABDALA *et al.*, 2012; DEL RIO *et al.*, 2015). Em ratos Wistar normotensos submetidos ao mesmo processo cirúrgico de desnervação carotídea, foi possível observar uma diminuição de 10 mmHg na pressão arterial basal (SABINO *et al.*, 2013).

Apesar de poucos estudos em humanos, evidências recentes indicam que pacientes portadores de IC decorrentes de causas isquêmicas, quando submetidos a ressecção uni ou bilateral do CC, apresentaram redução da atividade autonômica e quimiorreflexa periférica, somada ao aumento na resistência à atividade física por até dois meses. (PONIKOWSKI *et al.*, 2017).

Tendo em vista a somatória de evidências que relacionam a atuação do CC nas doenças cardiovasculares como na HA e IC, surge a possibilidade de uma nova linha terapêutica baseada na intervenção direta, unilateral ou bilateral, nos CC com o intuito de diminuir a progressão de seus processos fisiopatológicos, refletindo na melhora clínica do paciente.

2. HIPÓTESE

Levando em consideração os efeitos deletérios da hiperatividade simpática nos portadores de IC, somado a atuação simpatotônica exercida pelo CC, a hipótese é que o bloqueio da atividade do CC pela sua desnervação prévia à indução da IC pela doxorrubicina, pode diminuir a atividade simpática, melhorar a modulação autonômica e, conseqüentemente, propiciar a melhora na função cardíaca e a redução da mortalidade.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência do CC na evolução da IC induzida pela doxorrubicina. Visando alcançar o objetivo proposto, este projeto foi dividido em três etapas:

1º avaliar a influência da desnervação carotídea na função cardiovascular e autonômica cardíaca;

2º avaliar os efeitos cardiotóxicos da doxorrubicina na função cardiovascular e autonômica cardíaca;

3º avaliar o efeito da desnervação do CC nos animais tratados com doxorrubicina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – ANIMAIS E GRUPOS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 340 e 370 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais serão mantidos agrupados no biotério do InCor, com temperatura controlada (22°C – 24°C) e luminosidade em ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e comida estavam disponíveis sem restrição, a dieta foi normoproteica (12% de proteína). Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA da FMUSP sob registro 4412/16/07.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

GRUPO I – Grupo Controle + Salina (CSAL): Animais foram submetidos à manipulação cirúrgica no pescoço; no 8º dia após a cirurgia os animais receberam seis aplicações de solução fisiológica, a cada 4 dias, por via intraperitoneal, no mesmo volume a ser administrado da doxorrubicina (n=7).

GRUPO II – Grupo Controle + Doxorrubicina (CDOX): Animais foram submetidos à manipulação cirúrgica no pescoço; no 8º dia após a cirurgia os animais receberam, por via intraperitoneal, seis aplicações de doxorrubicina (Libbs – [2 mg /ml]) na dose de 2,5 mg/kg, a cada 4 dias, (n=12).

GRUPO III – Grupo Desnervação do Corpúsculo Carotídeo + Solução Salina (DSAL): Animais foram submetidos à manipulação cirúrgica na região cervical ventral com desnervação do corpúsculo carotídeo; no 8º dia após a cirurgia os animais receberam seis aplicações de solução fisiológica, a cada 4 dias por via peritoneal, no mesmo volume a ser administrado da doxorrubicina (n=04).

GRUPO IV – Grupo Desnervação do Corpúsculo Carotídeo + Doxorrubicina (DDOX):

Animais foram submetidos à manipulação cirúrgica no cervical ventral com desnervação do corpúsculo carotídeo; no 8º dia após a cirurgia os animais receberam seis aplicações de doxorrubicina (Libbs – [2 mg /ml]) na dose de 2,5 mg/kg, a cada 4 dias por via peritoneal (n=12).

O tamanho da amostra para esta pesquisa foi baseado em projetos anteriores que usaram uma quantidade mínima de 8 animais por grupo e alcançaram resultados satisfatórios para valores de pressão arterial.

O processo de eutanásia, quando necessário, foi realizado por *overdose* da associação anestésica de Xilazina (15mg/kg) e Ketamina (90mg/kg) por via intraperitoneal. Os animais eutanasiados foram destinados a câmara fria localizada no biotério do InCor/FMUSP, para posterior remoção por empresa especializada (Loga) contratada para destinar corretamente resíduos biológicos.

4.2 – DESNERVAÇÃO DO CORPÚSCULO CAROTÍDEO

Optamos por adaptar técnica da ligadura bilateral da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo desenvolvida por Franchini e Krieger, 1992. Previamente à cirurgia, os animais foram anestesiados pelo isoflurano [1ml/ml] na concentração de 5% e mantidos a 2,5%. O início da cirurgia ocorreu através de uma incisão na linha mediana da região cervical ventral, seguida por separação dos músculos que recobrem a traquéia e localização da bifurcação ou seio carotídeo. A bifurcação da carótida comum foi dissecada para exposição do corpúsculo carotídeo, neste momento não ligamos a artéria que irriga o CC, mas localizamos e

seccionamos o nervo sinusal (Hering), próximo do nervo glossofaríngeo. O procedimento foi realizado bilateralmente (Figura 1).

Figura 1. Inervação do corpo carotídeo e dos barorreceptores carotídeos da bifurcação da carótida (Desenho S. Lacchini).

O controle da dor pós-operatória ocorreu pela administração de 8mg/kg de cloridrato de tramadol [50mg/ml] por via intramuscular(IM), acrescido de 50mg/kg de dipirona sódica [500mg/ml] por via intramuscular; todos os animais receberam 20mg/kg de antibiótico Cefazolina [100mg/ml].

4.3 – INDUÇÃO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA PELA DOXORRUBICINA

O quadro de insuficiência cardíaca foi induzido de acordo com o protocolo de Singal. et al (2017) que consiste na administração de seis aplicações de doxorubicina (Libb's - Fauldoxo 50mg), por via intraperitoneal, a cada 4 dias na dose de 2,5mg/kg, s (Figura 2).

Figura 2 – Administração de doxorubicina pela via intraperitoneal.

4.4 – AVALIAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAMA

Após 35 dias do começo da indução da insuficiência cardíaca, os animais foram anestesiados com isoflurano a 5% e mantida a anestesia a 2,5% para a realização do exame ecocardiográfico.

A avaliação morfofuncional foi feita no módulo Bidimensional, M e tecidual pelo equipamento Sonos 5500 da Hewlett Packard. Foi utilizado o transdutor linear e multifrequencial (10-14mHz); as imagens foram gravadas e armazenadas em fitas cassetes para posterior conferência (Figura 3).

Figura3 – Aparelho de ecocardiograma.

4.5 – CANULAÇÃO PARA AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS

Após 35 dias do começo da indução da insuficiência cardíaca, os animais foram anestesiados por meio de isoflurano a 5% e mantido anestesia a 2,5% para colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,28 mm conectadas a uma peça de PE-100, com diâmetro interno de 0,80 mm). As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica heparinizada e posicionadas no interior da artéria e veia femorais esquerdas para registro da PA e frequência cardíaca. A extremidade da cânula foi conectada ao transdutor de pressão ocluído com pinos de aço inoxidável.

Após as extremidades da PE-10 serem posicionadas na artéria e veia, ambas foram fixadas com fio de algodão, suas extremidades mais calibrosas (P100) foram passadas por via subcutânea até a região dorsal da coluna cervical, onde foram exteriorizadas e fixadas na pele com fios de algodão. Após o término do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma injeção de penicilina (Benzetácil®, Fontoura-Wyeth, 60.000 U), e Cloridrato de Tramadol [50mg/ml], (2mg/kg) (Figura 4).

Figura 4 – Esquema da canulação: À esquerda: posição anátomo-cirúrgica da canulação de artéria e veia femoral. À direita: o feixe vâsculo nervoso, composto pela veia femoral esquerda, artéria femoral esquerda e nervo femoral esquerdo.

4. 6 – AVALIAÇÃO DO REFLEXO BARORRECEPTOR

Para aferir a sensibilidade barorreflexa, os pressoreceptores foram desafiados através da infusão de fenilefrina seguida da administração de nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (0,25-32,0µg/Kg) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), um potente estimulador alfa-1 cuja ação predominante é a vasoconstrição das arteríolas periféricas, foi administrada em doses crescentes pela cânula da veia femoral. O referido fármaco foi escolhido por aumentar a pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa gerenciada pelos pressoreceptores.

O efeito oposto, ou seja, a redução da pressão arterial com resposta taquicárdica, também comandada pelos pressoreceptores, foi induzida pela infusão de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (0,05-1,6 µg/Kg) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como veias, cuja ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMO cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos.

Na avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou o mínimo da pressão arterial média (PAM) reduziu os valores obtidos no período controle. Constatou-se a mesma redução quanto à frequência cardíaca (FC), imediatamente antes da infusão das drogas para posterior quantificação de respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através da divisão da variação da frequência cardíaca (FC) pela variação da PAM, ITR = índice de taquicardia reflexa e IBR = índice de bradicardia reflexa) (Figura 5).

Figura 5 – Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.

4.7 – MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL, INTERVALO DE PULSO, LABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL E DO INTERVALO DE PULSO

Os registros de pressão pulsátil continuamente forneceram valores diretos da pressão arterial de todos os grupos experimentais. A cânula de pressão arterial foi conectada a um tubo de polietileno (PE-50) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db; GouldSaltatham) que, por sua vez, se ligava a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.) O sinal analógico de pressão arterial foi convertido para digital (Stemtech, Inc.) e registrado em tempo real por um microcomputador com sistema CODAS, com frequência de amostragem de 2000 Hz por canal.

A análise dos sinais da pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição. O referido software permite a detecção de picos máximos e mínimos da curva da pressão de cada batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A FC no intervalo de pulso (IP) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos, os

resultados foram apresentados em valores médios e desvio padrões dos períodos analisados de FC e PA. As planilhas de dados obtidas foram analisadas por um programa comercial de análise Excel 2017, onde foi calculado a média, desvio padrão da PAM, PAS e PAD de cada animal. A labilidade da PA de cada animal foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal.

4.8 – VARIABILIDADE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA (ANÁLISE ESPECTRAL MODELAMENTO AUTO-REGRESSIVO)

Cada batimento cardíaco foi identificado através de um algoritmo implementado no Windaq, que automaticamente realiza a detecção dos intervalos de pulso, do evento sistólico da onda do sinal de pressão arterial. Após a leitura automática foi realizada uma inspeção visual para identificar e/ou corrigir alguma marcação incorreta. Posteriormente, a série temporal de cada sinal a ser estudado foi gerada, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Quando necessário, utilizamos a interpolação linear 24 horas, que detectou a frequência central, número e potência de cada componente (PAGANI 1986; PAGANI 1987). A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 a 3 Hz. A análise foi feita através do programa CardioSeries e utilizado a regressiva rápida de Fourier.

A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: altas frequências (HF), entre 0,75 e 3 Hz; baixas frequências (LF), entre 0,2 e 0,75 Hz e muito baixas frequências (VLF), menores que 0,2 Hz.

4.9 – AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS QUIMIORRECEPTORES

O teste de sensibilidade do quimiocarotídeo ocorreu através da administração de cianeto de potássio (KCN) pela veia, levando a um déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia citotóxica, a qual é detectada pelas células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo, ativando o quimiorreflexo, caracterizado basicamente pelo aumento da pressão arterial por estimulação simpática, acompanhada de bradicardia devida à resposta parassimpática (FRANCHINI e KRIEGER, 1993; HAIBARA *et al.*, 1995).

A avaliação do quimiorreflexo foi adaptada do protocolo Franchini & Kriger, 1992, ocorreu pela análise da variação da PAS após a administração endovenosa de cianeto de potássio (KCN, Merck), nas doses de 60 e 100 µg/kg. O sinal de PA basal foi registrado por 30 segundos, posteriormente o KCN foi administrado e a PA registrada por mais 30 segundos.

Os valores da diferença de pressão arterial sistólica (Δ PAS mmHG), obtidos pela comparação entre os e os valores basais e os valores após a injeção do KCN, foram usados para atestar a eficácia da cirurgia de deservação do corpúsculo carotídeo, assim como, para avaliar a resposta nos animais que receberam doxorrubicina (Figura 6).

Figura 6 – Resposta quimiorreflexa a administração de KCN.

4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) duas vias, com teste complementar de Tukey foi utilizada para avaliar a significância estatística das variáveis relacionadas ao peso corporal, hemodinâmicas, sensibilidade baro e quimiorreflexa, modulação autonômica da frequência e pressão arterial, ecocardiograma e pesagem de órgãos. A mortalidade foi expressa pela curva de Kaplan Meier, calculada pelo Q_i quadrado e pós teste de Logrank. Foram aceitos como estatisticamente significativos os níveis $p \leq 0,05$.

4.11 – SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Figura 7 – Sequência Experimental

5. RESULTADOS

5.1 – PESO CORPORAL NA INDUÇÃO DA IC

Os valores encontrados para peso corporal no início do protocolo, antes das intervenções, não demonstraram diferença estatística entre os grupos: CSAL ($375,66 \pm 16,58$ g); CDOX ($353,83 \pm 5,28$ g); DSAL ($358,18 \pm 18,07$ g) e DDOX ($340,00 \pm 7,16$ g). (**Figura 8**).

Figura 8: Valores de Média e erro padrão da média dos valores de peso corporal no início do protocolo, antes das intervenções. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

A análise não revelou efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,30) = 0,001$, $p=0,96$] para o peso corporal no início da indução da IC.

Ao final do período de observação (35 dias), o peso foi menor no grupo CDOX ($365,18 \pm 11,23$ g) em relação ao grupo CSAL ($471,66 \pm 24,44$ g), $p \leq 0,05$. De forma semelhante, o grupo DDOX ($333,83 \pm 10,25$ g) apresentou peso corporal reduzido quando comparado aos grupos DSAL ($439,60 \pm 13,06$ g) e CSAL, $p \leq 0,05$. (**Figura 9**).

Figura 9: Valores de Média e erro padrão da média dos valores de peso corporal ao final do período experimental. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

Quando avaliado o peso no final do período de observação, não encontramos efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,30)=0,0009$, $p=0,98$].

Entretanto, encontramos o efeito da droga $F(1,30)=42,35$, $p=0,001$].

5.2 AVALIAÇÕES HEMODINÂMICAS

5.2.1 – Pressão Arterial

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre os valores da PAS dos diferentes grupos: CSAL ($127,16 \pm 2,10$ mmHg), CDOX ($124,84 \pm 5,28$ mmHg), DSAL ($139,05 \pm 5,10$ mmHg) e DDOX ($121,39 \pm 5,92$ mmHg) (**Figura 10**).

A análise não revelou efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,23$, $p=0,08$] para a pressão arterial sistólica. Porém, o fator droga apresentou efeito $F(1,23)=5,64$, $p=0,02$.

Figura 10: Valores de Média e erro padrão da média Pressão arterial sistólica. ANOVA two-way, pós-teste Tukey. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Em relação à PAM, os valores encontrados não demonstraram diferença estatística entre os grupos, conforme descritos a seguir: CSAL ($115,99 \pm 1,49$ mmHg); CDOX ($108,17 \pm 2,7$ mmHg), DSAL ($110,74 \pm 1,07$ mmHg) e DDOX ($104,05 \pm 4,76$ mmHg) (**Figura 11**). Não houve efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24) = 0,02$, $p = 0,87$].

Figura 11: Valores de Média e erro padrão da média para Pressão arterial média ANOVA two-way, pós-teste Tukey, Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Os valores encontrados da PAD não demonstraram diferença estatística entre os grupos, conforme segue-se: CSAL ($99,63 \pm 2,056$ mmHg); CDOX ($94,09 \pm 2,94$ mmHg), DSAL ($94,41 \pm 1,34$ mmHg) e DDOX ($91,08 \pm 4,20$ mmHg) (**Figura 12**). Não houve efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,02$, $p=0,87$].

Figura 12: Valores de média e erro padrão da média para Pressão arterial diastólica. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

5.2.2 – Frequência cardíaca

Os grupos CDOX ($408,86 \pm 16,57$ bpm), DSAL ($396,66 \pm 20,29$ bpm) e DDOX ($430,00 \pm 25,26$ bpm) apresentaram aumento da FC em relação ao grupo CSAL ($312,37 \pm 3,65$), $p \leq 0,05$ (**Figura 13**). A análise não revelou efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,46$, $p=0,07$] para a frequência cardíaca. Porém, o fator droga [$F(1,23)=5,64$, $p=0,0009$] e o fator intervenção apresentaram efeito significativo [$F(1,23)=5,64$, $p=0,0009$].

Figura 13: Valores de média e erro padrão da média para Frequência cardíaca. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$.

5.3. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

5.3.1. Resposta Taquicárdica

Os resultados da resposta taquicárdica às reduções da PAS não demonstraram diferença estatística entre os grupos. Os valores encontrados foram: CSAL ($2,717 \pm 0,53$ bpm/mmHg); CDOX ($1,93 \pm 0,48$ bpm/mmHg); DSAL ($1,73 \pm 0,389$ bpm/mmHg); DDOX ($1,42 \pm 0,5$ bpm/mmHg) (**Figura 14**). A análise da resposta taquicárdica demonstrou que não houve efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=0,15$, $p=0,69$].

Figura 14: Valores de média e erro padrão da média para Resposta taquicárdica às reduções induzidas da PAS. ANOVA *two-way*, pós-teste. Não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

5.3.2 – Resposta Bradicárdica

Os resultados demonstraram redução da resposta bradicárdica ao aumento da PAS no Grupo CDOX ($-1,07 \pm 0,34$ bpm/mmHg) em relação ao CSAL ($-2,69 \pm 0,170$ bpm/mmHg), $p \leq 0,05$. A mesma redução foi evidenciada no DDOX ($-1,02 \pm 0,40$) em relação ao grupo CSAL, $p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($-1,54 \pm 0,25$ bpm/mmHg) não foi diferente dos demais grupos. (**Figura 15**). A respeito do efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,14$, $p=0,08$] não houve significância estatística, porém, o fator droga apresentou efeito $F(1,23)=12,14$, $p=0,002$.

Figura 15: Valores de média e erro padrão da média para a Resposta bradicárdica. às reduções induzidas da PAS. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$

5.4 – AVALIAÇÃO QUIMIORREFLEXA

Os resultados demonstram que a variação da resposta pressórica frente a administração de 60ug/kg de KCN foi menor nos grupos CDOX ($17,54 \pm 2,05$ mmHg) e DDOX ($-5,33 \pm 2,57$ mmHg) quando comparados ao grupo CSAL ($24,69 \pm 5,61$ mmHg), $p \leq 0,05$. De forma similar, o grupo DDOX também apresentou redução frente ao grupo DSAL ($4,21 \pm 0,68$ mmHg), $p \leq 0,05$ (**Figura 16**). Não se identificou diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,26)=0,1547$, $p=0,69$], mas houve efeito para os fatores droga [$F(1,26) 50,66$, $p=0,001$] e intervenção [$F(1,26)=7,50$, $p=0,01$].

Figura 16: Valores de média e erro padrão da média para a Resposta Quimiorreflexa 60ug/kg de KCN. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$

Os resultados pressóricos oriundos da administração de 100ug/kg demonstram menor variação de pressão nos grupos CDOX ($56,63 \pm 5,14$ mmHg) e DDOX ($-21,16 \pm 5,37$ mmHg) quando comparados ao grupo CSAL ($65,78 \pm 0,61$ mmHg), $p \leq 0,05$. De forma similar, o grupo DDOX também apresentou redução frente ao grupo CDOX e DSAL ($7,22 \pm 1,11$ mmHg, $p \leq 0,05$) (**Figura 17**). Não se identificou diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=3,284$, $p=0,08$], mas os fatores droga [$F(1,24)=164,9$, $p=0,001$] e intervenção [$F(1,24)=12,49$, $p=0,001$] apresentaram efeito.

Figura 17: Valores de média e erro padrão da média para a Resposta Quimiorreflexa 100ug/kg de KCN. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$

5.5 – AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO E FREQUÊNCIA

5.5.1 – Domínio do tempo

Os resultados demonstraram que o intervalo de pulso (IP) foi menor nos grupos DDOX ($142,33 \pm 8,15$ ms), DSAL ($152,37 \pm 7,47$ ms) e CDOX ($159 \pm 9,66$ ms) quando comparados ao grupo CSAL ($192,34 \pm 2,21$ ms), $p \leq 0,05$ (**Figura 18**). A estatística revelou que houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,23)=5,835, p=0,02]$, assim como, houve efeito para o fator droga $[F(1,23)=13,20, p=0,001]$ e fator intervenção $F(1,23)=15,54 p=0,0006$.

Figura 18: Valores de média e erro padrão da média para Intervalo de Pulso. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$.

Com relação ao desvio padrão (DP) do intervalo de pulso os resultados evidenciam que o grupo DDOX ($5,28 \pm 0,53$ ms) apresentou redução em relação ao grupo DSAL ($6,99 \pm 0,64$ ms), $p \leq 0,05$. Comparados com os outros grupos, seus valores CSAL ($7,54 \pm 0,95$ ms) e CDOX ($6,99 \pm 0,64$ ms) não apresentaram diferença estatística (**Figura 19**). A estatística revelou a diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,23)=7,44, p=0,01]$, assim como, houve efeito para o fator droga $[F(1,23)=10,62, p=0,003]$.

Figura 19: Valores de médio e erro padrão da média para intervalo de pulso. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$.

Com relação a variância do intervalo de pulso, os dados mostram que houve redução no grupo DDOX ($29,56 \pm 5,59$ ms²) frente ao grupo DSAL ($138,60 \pm 36,00$ ms²), $p \leq 0,05$. O grupo CDOX ($65,97 \pm 16,69$ ms²) não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo CSAL $p=0,058$. (**Figura 20**). A estatística revelou a diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,23)=6,04, p=0,02]$, assim como, houve efeito para o fator droga $[F(1,23)=10,52, p=0,003]$.

Figura 20: Valores de média e erro padrão da média para variância do intervalo de pulso. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$

Com relação ao RMSSD, o grupo DDOX ($4,28 \pm 0,48\text{ms}$) apresentou redução em relação ao grupo DSAL ($4,97 \pm 0,19\text{ ms}$) * $p \leq 0,05$. Não houve diferença nos grupos CSAL ($5,46 \pm 0,42\text{ ms}$) e CDOX ($6,29 \pm 0,35\text{ms}$) quando comparado com outros grupos (**Figura 21**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=2,48$, $p=0,12$]. Porém, houve efeito para o fator droga [$F(1,23)=6,72$, $p=0,01$].

Figura 21: Valores de média e erro padrão da média para RMSSD. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$

5.5.2 Domínio da frequência

No domínio da frequência os dados mostraram que o VLF Abs apresentou tendência à diferença estatística somente para o grupo DDOX ($7,97 \pm 1,92\text{ms}^2$) em comparação ao grupo DSAL ($26,12 \pm 4,72\text{ms}^2$), $p=0,06$ (**Figura 22**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=4,230$, $p=0,06$].

Figura 22: Valores de média e erro padrão da média para VLF Abs. ANOVA two-way, pós-teste Tukey

Com relação ao LF Abs, os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos, conforme se observa pelos os valores obtidos: CSAL ($1,91 \pm 0,58 \text{ ms}^2$), CDOX ($3,96 \pm 0,92 \text{ ms}^2$), DSAL ($3,54 \pm 1,2\text{ms}^2$) e DDOX ($2,38 \pm 0,71$) (**Figura 23**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,75$, $p=0,06$].

Figura 23: Valores de média e erro padrão da média para LF Abs. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey.

Com relação ao HF Abs, os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos. Os valores obtidos foram CSAL ($8,19 \pm 1,39 \text{ ms}^2$), CDOX ($7,18 \pm 0,75 \text{ ms}^2$), DSAL ($10,03 \pm 1,52 \text{ ms}^2$) e DDOX ($5,89 \pm 1,64 \text{ ms}^2$) (**Figura 24**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,23)=0,90, p=0,35]$].

Figura 24: Valores de média e erro padrão da média para HF Abs. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey.

Com relação ao VLF%, os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos. Os valores obtidos foram CSAL ($49,45 \pm 1,85\%$), CDOX ($48,00 \pm 4,19\%$), DSAL ($57,25 \pm 2,78 \%$) e DDOX ($46,29 \pm 5,80 \%$) (**Figura 25**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=1,362$, $p=0,25$].

Figura 25: Valores de média e erro padrão da média para VLF%. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey.

Com relação ao LF%, os resultados demonstraram que houve aumento entre os grupos DDOX ($14,00 \pm 1,38 \%$) e CDOX ($16,00 \pm 1,24$) em relação ao grupo CSAL ($6,73 \pm 1,03 \%$), $p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($9,00 \pm 1,47\%$) foi diferente dos animais CDOX e DDOX (**Figura 26**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=2,42$, $p=0,13$]. Os dados demonstraram que houve efeito no fator droga [$F(1,23)=27,03$, $p=0,0001$].

Figura 26: Valores de média e erro padrão da média para LF%. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.* $p \leq 0,05$.

Com relação ao HF%, os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos. Os valores obtidos foram CSAL ($44,00 \pm 1,65\%$), CDOX ($35,83 \pm 3,78\%$), DSAL ($33,50 \pm 1,55\%$) e DDOX ($39,86 \pm 4,89\%$) (**Figura 27**). A estatística revelou que houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=4,38$, $p=0,04$].

Figura 27: Valores de média e erro padrão da média para HF%. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

Com relação ao LF (nu), os resultados demonstraram que houve aumento entre os grupos DDOX ($27,71 \pm 2,70$) e CDOX ($32,50 \pm 2,64$) em relação ao grupo CSAL ($14,27 \pm 2,05$),

$p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($23,00 \pm 2,94$) não foi diferente dos demais grupos (**Figura 28**). A estatística revelou que houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=6,07$, $p=0,02$]. Similar ao fator intervenção, os dados demonstraram que também houve efeito no fator droga [$F(1,23)=17,50$, $p=0,0004$].

Figura 28: Valores de média e erro padrão da média para LF(nu). ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

Com relação ao HF(nu), os resultados demonstraram que houve diminuição entre os grupos DDOX ($72,29 \pm 2,70$) e CDOX ($67,50 \pm 2,64$) em relação ao grupo CSAL ($85,73 \pm 2,05$), $p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($77,00 \pm 2,94$) não foi diferente dos demais grupos (**Figura 29**). A estatística revelou que houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=6,07$, $p=0,02$]. Similar ao fator intervenção a estatística demonstra que houve efeito no fator droga [$F(1,23)=17,50$, $p=0,0004$].

Figura 29: HF(nu). ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p \leq 0,05$.

Com relação ao balanço simpato vagal - LF/HF, os resultados demonstraram que houve aumento nos grupos DDOX ($0,42 \pm 0,70$) e CDOX ($0,53 \pm 0,07$) em relação ao grupo CSAL ($0,19 \pm 0,03$), $p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($0,33 \pm 0,06$) não foi diferente dos demais grupos (**Figura 30**). A estatística revelou que houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,23)=4,71, p=0,04]$. Similarmente, os dados demonstram que houve efeito no fator droga [$F(1,23)=13,95, p=0,001$].

Figura 30: Valores de média e erro padrão da média para LF/HF. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$

5.6 – CONTROLE AUTONÔMICO DA PRESSÃO ARTERIAL

Os resultados demonstram que não houve diferença significativa nos valores da PAS entre os grupos conforme descritos a seguir: CSAL ($127,16 \pm 2,10$ mmHg), CDOX ($124,84 \pm 5,28$ mmHg), DSAL ($139,05 \pm 5,10$ mmHg) e DDOX ($121,39 \pm 5,92$ mmHg) (**Figura 31**). A análise não revelou efeito de interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,23$, $p=0,08$] para a pressão arterial sistólica. Porém, o fator droga apresentou efeito $F(1,23)=5,64$, $p=0,02$].

Figura 31: Valores de média e erro padrão da média para PAS. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey.

Com relação ao desvio padrão da PAS, os valores obtidos para todos os grupos CSAL ($5,13 \pm 0,52$ mmhg), CDOX ($4,21 \pm 0,46$ mmhg), DSAL ($6,54 \pm 0,50$ mmhg) e DDOX ($4,17 \pm 0,58$ mmhg) não revelaram diferença. A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,23)=3,32$, $p=0,08$]. Porém, houve efeito no fator droga [$F(1,23)=7,12$, $p=0,01$]. (**Figura 32**)

Figura 32: Valores de média e erro padrão da média para Desvio padrão da PAS. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

Com relação a variância da PAS, os valores obtidos para todos os grupos CSAL ($28,83 \pm 6,30 \text{ mmHg}^2$), CDOX ($18,73 \pm 4,20 \text{ mmHg}^2$), DSAL ($43,47 \pm 6,68 \text{ mmHg}^2$) e DDOX ($19,43 \pm 5,08 \text{ mmHg}^2$) não revelaram diferenças (**Figura 33**). Porém, houve efeito no fator droga [$F(1,23)=6,22$, $p=0,02$].

Figura 33: Valores de média e erro padrão da média para Variância da PAS. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

Com relação a banda de baixa frequência (LF) da PAS, os grupos DDOX ($2,42 \pm 0,75 \text{ mmHg}$) e CSAL ($2,96 \pm 0,22 \text{ mmHg}$) estão menores que o grupo DSAL ($8,24 \pm 1,07 \text{ mmHg}$), $*p \leq 0,05$.

O grupo CDOX ($2,82 \pm 0,83$) não apresentou diferença para os demais grupos (**Figura 34**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; [$F(1,23)=3,32$, $p=0,08$]. A estatística mostra que houve efeito no fator droga

[F(1,23)=21,16, p=0,0001] e, de forma similar, houve efeito no fator intervenção [F(1,23)=14,19 p=0,001] e fator droga [F(1,23)=14,19, p=0,001]

Figura 34: Valores de média e erro padrão da média para LF da PAS. ANOVA two-way, pós-teste Tukey, *p≤0,05.

A Tabela 2 mostra os resultados referentes a VFC no domínio do tempo.

Tabela 2: VFC no domínio do tempo dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX)

	CSAL		CDOX		DSAL		DDOX	
IP(ms)	192.34	± 2.21	150.37	± 9.66 *	152.41	± 7.47 *	142.33	± 8.14 *
DP (ms)	7.54	± 0.95	6.99	± 0.64	11.50	± 1.46	5.28	± 0.53 *
Variancia (ms)	65.97	± 16.68	50.97	± 9.14 #	138.60	± 35.99	29.56	± 5.59 *
RMSSD (ms)	5.46	± 0.42	4.97	± 0.19	6.29	± 0.35	4.28	± 0.48 *

*p≤0,05 vs CSAL; #p=0.058 vs CSAL

Os resultados da Tabela 3 são referentes a variabilidade da PA e de FC no domínio da frequência.

Tabela 3: VFC e da PA dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX).

	CSAL		CDOX		DSAL		DDOX	
VLF abs	16.43	±4.06	17.10	± 5.35	26.12	± 4.71	7.97	± 1.92 #
LF abs	1.91	± 0.57	3.96	± 0.92	3.54	± 1.20	2.38	± 0.70

HF abs	8.19	± 1.39	7.18	± 0.75	10.03	± 1.52	5.89	± 1.63
VLF %	49.45	± 1.84	48.00	± 4.18	57.25	± 2.78	46.29	± 5.79
LF %	6.73	± 1.02	16.00	± 1.23*	9.00	± 1.47	14.00	± 1.38 *
HF %	44.00	± 1.65	35.83	± 3.78	33.50	± 1.55	39.86	± 4.89
LF (nu)	14.27	± 2.04	32.50	± 2.64*	23.00	± 2.94	27.71	± 2.69 *
HF (nu)	85.73	± 2.04	67.50	± 2.64*	77.00	± 2.94	72.29	± 2.69 *
LF/HF	0.19	± 0.03	0.53	± 0.06*	0.33	± 0.06	0.42	± 0.06 *
PAS	127.16	± 2.09	124.84	± 2.33	139.05	± 5.09	121.39	± 5.91
DP PAS	5.13	± 0.51	4.21	± 0.45	6.54	± 0.50	4.17	± 0.57
Variância PAS	28.93	± 6.29	18.73	± 4.20	43.47	± 6.67	19.43	± 5.07
LF abs PAS	2.96	± 0.22	2.82	± 0.82	8.24	± 1.07 *+	2.42	± 0.75
Alfa LF	0.71	±0.09	1.29	± 0.19	0.67	± 0.16	1.24	± 0.30 \$

*p≤0,05 vs CSAL; #p=0.06 vs DSAL e \$p≤0.05 vs DSAL, +p≤0.05 vs DDOX

5.7 – AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACA

5.7.1 – Volume na sístole

Os dados mostram que não houve diferença entre os grupos para os valores encontrados nos grupos CSAL ($141,44 \pm 12,59 \mu\text{L}$), CDOX ($139,79 \pm 15,31 \mu\text{L}$), DSAL ($187,27 \pm 45,46 \mu\text{L}$) e DDOX ($204,04 \pm 17,66 \mu\text{L}$)(**Figura 35**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,24)=0,19, p=0,66]$, mas houve efeito no fator intervenção $[F(1,24)=7,02 p=0,01]$.

Figura 35: Valores de média e erro padrão da média para Volume na sístole. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

5.7.2 – Volume na diástole

Os dados mostram que o volume na diástole diminuiu no grupo DDOX ($407,13 \pm 16,00$ ul) em relação ao DSAL ($819,12 \pm 92,95$ ul) e ao CSAL ($710 \pm 58,13$ ul), $*p \leq 0,05$. De forma similar o volume diastólico está reduzido no grupo CDOX ($378,01 \pm 11,68$ ul) em relação ao grupo CSAL, $p \leq 0,05$ (**Figura 36**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,88$, $p=0,35$], mas houve efeito no fator intervenção [$F(1,24)=78,48$ $p=0,0001$].

Figura 36: Valores de média e erro padrão da média para Volume na diástole. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, $* p \leq 0,05$.

5.7.3 – Diâmetro na sístole

Os valores encontrados não evidenciaram diferenças significativas para os valores obtidos nos grupos CSAL ($5,19 \pm 0,27$ mm), CDOX ($4,83 \pm 0,31$ mm), DSAL ($4,72 \pm 0,31$ mm) e DDOX ($5,56 \pm 0,32$ mm) (**Figura 37**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=3,40$, $p=0,07$].

Figura 37: Valores de média e erro padrão da média para Diâmetro na sístole . ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

5.7.4 – Diâmetro na diástole

Os dados obtidos demonstram que o diâmetro na diástole reduziu no grupo DDOX ($7,96 \pm 0,21$ mm) em relação aos grupos DSAL ($9,22 \pm 0,43$ mm) e CSAL ($8,93 \pm 0,20$ mm), $*p \leq 0,05$. De forma similar, o grupo CDOX ($8,08 \pm 0,17$ mm) demonstrou redução no diâmetro na diástole em relação ao grupo CSAL, $*p \leq 0,05$ (**Figura 38**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,24)=0,73, p=0,39]$, entretanto, houve diferença no efeito droga $[F(1,24)=20,41, p=0,0001]$.

Figura 38: Valores de média e erro padrão da média para Diâmetro na diástole . ANOVA two-way, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$

5.7.5 – Septo na sístole

Os valores encontrados evidenciaram a redução do septo na sístole nos grupos DDOX ($2,15 \pm 0,13$ mm) e CDOX ($2,47 \pm 0,13$ mm) em comparação ao grupo CSAL ($3,26 \pm 0,15$ mm), $p \leq 0,05$. O grupo DSAL ($2,73 \pm 0,25$ mm) não apresentou diferença em relação aos outros grupos (**Figura 39**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,46$, $p=0,5$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=18,54$, $p=0,0002$] e do fator intervenção [$F(1,24)=18,54$, $p=0,01$].

Figura 39: Valores de média e erro padrão da média para Septo na sístole. ANOVA two-way, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

5.7.6 – Septo na diástole

Os valores não evidenciaram diferenças significativas para os valores obtidos nos grupos CSAL ($1,65 \pm 0,08$ mm), CDOX ($1,52 \pm 0,04$ mm), DSAL ($1,44 \pm 0,13$ mm) e DDOX ($1,59 \pm 0,05$ mm) (**Figura 40**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=4,22$, $p=0,06$].

Figura 40: Valores de média e erro padrão da média para Septo na diástole. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

5.7.7 – Parede posterior na sístole

Os valores obtidos demonstraram redução da parede posterior no grupo DDOX ($2,28 \pm 0,14$ mm) em relação ao grupo CSAL ($2,94 \pm 0,13$ mm), $*p \leq 0,05$. Os valores dos grupos CDOX ($2,52 \pm 0,09$ mm) e DSAL ($2,56 \pm 0,26$ mm) não foram diferentes dos outros grupos (**Figura 41**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,26$, $p=0,61$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=6,01$, $p=0,02$] e do fator intervenção [$F(1,24)=4,60$, $p=0,04$].

Figura 41: Valores de média e erro padrão da média para Parede posterior na sístole. ANOVA two-way, pós-teste Tukey* $p \leq 0,05$.

5.7.8 – Parede posterior na diástole

Os valores obtidos demonstraram que houve redução na parede posterior na diástole no grupo DDOX ($1,58 \pm 0,05$ mm) em relação aos grupos DSAL ($2,56 \pm 0,26$ mm) e o grupo CSAL ($2,48 \pm 0,25$ mm), $*p \leq 0,05$. De forma similar, o grupo CDOX ($1,55 \pm 0,02$ mm) também apresentou redução em relação ao grupo CSAL, $*p \leq 0,05$. (**Figura 42**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,24)=0,26, p=0,61]$, porém houve efeito do fator droga $[F(1,24)=39,99, p=0,0001]$.

Figura 42: Valores de média e erro padrão da média para Parede posterior na diástole. ANOVA two-way, pós-teste Tukey, $* p \leq 0,05$.

5.7.9 – Aorta

Os valores encontrados não evidenciaram diferenças significativas para os valores obtidos nos grupos CSAL ($3,33 \pm 0,08$ mm), CDOX ($3,46 \pm 0,08$ mm), DSAL ($3,5 \pm 0,02$ mm) e DDOX ($3,33 \pm 0,09$ mm) (**Figura 43**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,24)=2,70, p=0,11]$.

Figura 43: Valores de média e erro padrão da média para Aorta. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

5.7.10 – Átrio Esquerdo

Os valores obtidos demonstram que houve redução do átrio esquerdo no grupo DDOX ($5,53 \pm 0,33$ mm) em relação ao grupo DSAL ($6,8 \pm 0,32$ mm) e ao grupo CSAL ($7,07 \pm 0,25$ mm), $*p \leq 0,05$. A mesma redução pode ser notada no grupo CDOX ($5,98 \pm 0,16$ mm) quando comparado com o grupo CSAL, $*p \leq 0,05$ (**Figura 44**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,98$, $p=0,75$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=17,99$, $p=0,0003$].

Figura 44: Valores de média e erro padrão da média para Átrio esquerdo. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, $*p \leq 0,05$.

5.7.11 – Aorta/Átrio Esquerdo

Os valores obtidos demonstram que existe uma forte tendência no aumento da relação aorta/átrio esquerdo no grupo DDOX ($0,61 \pm 0,03$ mm) em relação ao grupo DSAL ($0,51 \pm 0,32$ mm), $p=0,059$. Quando comparado o grupo DDOX com CSAL ($0,47 \pm 0,01$) nota-se o aumento na razão, $*p \leq 0,05$. O mesmo aumento da relação aorta/átrio esquerdo pode ser observado ao comparar o grupo CDOX ($0,58 \pm 0,03$) com o grupo CSAL, $*P \leq 0,05$ (**Figura 45**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $[F(1,24)=0,02, p=0,88]$, porém houve efeito do fator droga $[F(1,24)=18,34, p=0,0003]$.

Figura 45: Valores de média e erro padrão da média para Aorta/Átrio esquerdo. ANOVA two-way, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$; # $P=0,058$.

5.7.12 – FAC

Os resultados obtidos mostram redução da FAC no grupo DDOX ($43,18 \pm 3,64$ %) em relação ao grupo DSAL ($62,03 \pm 5,58$ %) e CSAL ($57,45 \pm 2,51$ %) $p \leq 0,05$. O valor do grupo CDOX ($48,64 \pm 2,81$ %) não apresentou diferença quando comparado aos outros grupos. A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=2,09$, $p=0,16$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=15,88$, $p=0,0005$]. (Figura 46)

Figura 46: Valores de média e erro padrão da média para FAC. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

5.7.13 – Fração de ejeção

Os resultados obtidos mostram que a fração de ejeção reduziu no grupo DDOX ($53,90 \pm 3.35\%$) em relação aos grupos DSAL ($76,55 \pm 6,95 \%$) e o CSAL ($78,19 \pm 3.35\%$), * $p \leq 0,05$. O valor do grupo CDOX ($68,23 \pm 4,16\%$) não apresentou diferença quando comparado aos de outros grupos (**Figura 47**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=1,678$, $p=0,20$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=11,08$, $p=0,0028$].

Figura 47: Valores de média e erro padrão da média para Fração de Ejeção. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey. * $p \leq 0,05$.

5.7.14 – E'/A'

Os resultados obtidos demonstram que houve redução na relação E'/A' no grupo DDOX ($0,54 \pm 0,05$) em relação aos grupos DSAL ($1,75 \pm 0,11$) e CSAL ($1,64 \pm 0,12$), * $p \leq 0,05$. A mesma redução pode ser notada no grupo CDOX ($0,73 \pm 0,011$) em relação ao grupo CSAL, * $p \leq 0,05$ (**Figura 48**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=1,89$ $p=0,18$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=117,08$, $p=0,0001$].

Figura 48: Valores de média e erro padrão da média para E'/A' . ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey* $p \leq 0,05$.

5.7.15 – E'/E'

Os resultados obtidos demonstram que houve aumento na relação E'/E' no grupo DDOX ($34,83 \pm 2,19$) em relação aos grupos DSAL ($15,19 \pm 2,04$), CSAL ($13,04 \pm 2,33$) e CDOX ($25,64 \pm 2,45$) * $p \leq 0,05$. O mesmo aumento pode ser notado no grupo CDOX em relação ao grupo CSAL, * $p \leq 0,05$ (**Figura 49**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=4,76$ $p=0,03$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=40,21$, $p=0,0001$] e do fator intervenção [$F(1,24)=4,76$, $p=0,03$].

Figura 49: Valores de média e erro padrão da média para E/E'. ANOVA two-way, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

5.7.16 – E/A

Os valores encontrados não evidenciaram diferenças significativas para os valores obtidos nos grupos CSAL ($1,90 \pm 0,16$), CDOX ($1,80 \pm 0,09$), DSAL ($1,54 \pm 0,06$) e DDOX ($1,96 \pm 0,09$) (**Figura 50**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=3,75$, $p=0,06$].

Figura 50: Valores de média e erro padrão da média para E/A. ANOVA two-way, pós-teste Tukey.

5.7.17 – TRIV

Os resultados obtidos demonstram que houve aumento do TRIV no grupo DDOX ($30,64 \pm 1,78$ ms) em relação aos grupos DSAL ($23,25 \pm 1,43$ ms) e CSAL ($22,27 \pm 1,61$ ms). O valor obtido do grupo CDOX ($26,88 \pm 1,33$ ms) não apresentou diferença quando comparado aos outros grupos (**Figura 51**). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,67$, $p=0,41$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=12,46$, $p=0,001$].

Figura 51: Valores de média e erro padrão da média para TRIV. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

Os resultados da Tabela 4 são referentes às características morfofuncionais:

Tabela 4: Avaliação morfofuncional cardíaca dos grupos Controle Salina (CSAL), Controle Doxo (CDOX), Desnervado Salina (DSAL) e Desnervado Doxo (DDOX)

	CSAL	CDOX	DSAL	DDOX
Vol. Sist. (uL)	141,44 ± 12,59	139,79 ± 15,31	187,27 ± 45,46	204,04 ± 17,66
Vol. Diast.(uL)	710 ± 58,13	378,01 ± 11,68 *	819,12 ± 92,95	407,13 ± 16,00 **
Diâmetro Sist. (mm)	5,19 ± 0,27	4,83 ± 0,31	4,72 ± 0,31	5,56 ± 0,32
Diâmetro Diast (mm)	8,93 ± 0,20	8,08 ± 0,17 *	9,22 ± 0,43	7,96 ± 0,21 **
Septo Sist (mm)	3,26 ± 0,15	2,47 ± 0,13 *	2,73 ± 0,25	2,15 ± 0,13 *
Septo Diast (mm)	1,65 ± 0,08	1,52 ± 0,04	1,44 ± 0,13	1,59 ± 0,05
Parede Posterior Sist. (mm)	2,94 ± 0,13	2,52 ± 0,09	2,56 ± 0,26	2,28 ± 0,14 *
Parede Posterior Diast. (mm)	2,48 ± 0,25	1,55 ± 0,02 *	2,56 ± 0,26	1,58 ± 0,05 **
Aorta (mm)	3,33 ± 0,08	3,46 ± 0,08	3,5 ± 0,02	3,33 ± 0,09
Atrio Esq. (mm)	7,07 ± 0,25	5,98 ± 0,16 *	6,8 ± 0,32	5,53 ± 0,33 **
Aorta/Atrio Esq.	0,47 ± 0,01	0,58 ± 0,03 *	0,51 ± 0,32	0,61 ± 0,03 **
FAC (%)	57,45 ± 2,51	48,64 ± 2,81	62,03 ± 5,58	43,18 ± 3,64**
FE (%)	78,19 ± 3,35	68,23 ± 4,16	76,55 ± 6,95	53,9 ± 3,35 **
E' /A'	1,64 ± 0,12	0,73 ± 0,01 *	1,75 ± 0,11	0,54 ± 0,05 **
E/E'	13,04 ± 2,33	25,64 ± 2,45 *	15,19 ± 2,04	34,83 ± 2,19 **+
E/A	1,90 ± 0,16	1,80 ± 0,09	1,54 ± 0,06	1,96 ± 0,09
TRIV (ms)	22,27 ± 1,61	26,88 ± 1,33	23,25 ± 1,43	30,64 ± 1,78 **

*p≤0,05 vs CSAL; #p≤0,05 vs DSAL e +p≤0,05 vs CDOX.

5.8 – PESO DOS ÓRGÃOS

5.8.1 – Coração e ventrículo esquerdo

Os valores obtidos do peso cardíaco bruto evidenciaram redução nos grupos entre os grupos DDOX (1,03 ± 0,08g) e CDOX (1,08 ± 0,07g) em relação ao grupo CSAL (1,73 ± 0,06g) e grupo DSAL (1,75 ± 0,10g). A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; [F(1,20)=0,19, p=0,66], mas apresentou efeito para o fator droga ; [F(1,20)=69,60, p=0,001]. (**Figura 52**)

Figura 52: Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do coração. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$.

Os valores brutos obtidos do ventrículo esquerdo evidenciaram redução nos grupos DDOX ($0,90 \pm 0,06g$) e CDOX ($0,88 \pm 0,05g$) em relação ao grupo CSAL ($1,46 \pm 0,10 g$), * $p \leq 0,05$. A mesma redução pode ser notada no grupo DDOX em relação ao grupo DSAL ($1,56 \pm 0,09g$), * $p \leq 0,05$. A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,20)=0,28$, $p=0,59$], mas apresentou efeito para o fator droga ; $[F(1,20)=62,36$, $p=0,0001]$. . (Figura 53)

Figura 53: Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do ventrículo. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, * $p \leq 0,05$

5.8.2 – Pulmão

Os valores obtidos demonstraram redução do peso absoluto do pulmão no grupo DDOX ($2,48 \pm 0,09$ mm) em relação ao grupo CSAL ($3,23 \pm 0,12$ mm), $*p \leq 0,05$. Os valores dos grupos CDOX ($2,64 \pm 0,17$ mm) e DSAL ($3,12 \pm 0,24$ mm) não foram diferentes dos outros grupos. . A estatística revelou que não houve diferença no efeito da interação entre os fatores [intervenção versus droga; $F(1,24)=0,01$, $p=0,89$], porém houve efeito do fator droga [$F(1,24)=12,35$, $p=0,02$]. (Figura 54)

Figura 54: Valores de média e erro padrão da média para Peso absoluto do pulmão. ANOVA *two-way*, pós-teste Tukey, $*p \leq 0,05$.

5.9 – MORTALIDADE

Os dados obtidos demonstram que não houve diferença estatística entre os grupos CSAL($n=11$), CDOX($n=11$), DSAL($n=4$) e DDOX($n=12$). Sobrevivência grupo CSAL, CDOX e DSAL foi de 100% versus grupo DDOX de 85.71%. (Figura 55)

Figura 55: Curva de mortalidade de Kaplan-Meier

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do corpúsculo carotídeo na insuficiência cardíaca induzida pela DOX, com base na hipótese que a redução da atividade simpática dependente dos CC pudesse proporcionar efeitos positivos sistêmicos, cardiovasculares e autonômicos. Porém, a nossa hipótese não foi confirmada, pois a desnervação bilateral prévia do corpúsculo carotídeo, comprovada pela ausência de resposta ao KCN, não impediu a perda de peso, a disautonomia e alterações morfofuncionais cardíacas. Inclusive avaliações ecocardiográficas evidenciaram piora na função diastólica e sistólica pelo aumento da relação E/E' e diminuição na FAC. Afim de facilitar o entendimento dos dados obtidos, esta discussão foi dividida em relação aos objetivos traçados e os dados obtidos.

6.1 – PESO CORPORAL

Apesar da conhecida participação dos CC na hipertensão (ABDALAI *et al.*, 2012 e DEL RIO *et al.*, 2015) e da sua importância na sensibilidade da diminuição da glicose (POTOLSKY *et al.*, 2014), estudos diretos sobre a influência da desnervação do CC no peso corporal são inexistentes.

De modo similar ao estudo de FERNANDES *et al.*(2007) trabalhos conduzidos por RIBEIRO *et al.*(2013), visando demonstrar a relação dos CC na fisiopatologia da resistência insulínica e da hipertensão, em modelo de ratos previamente desnervados, não encontraram diferenças significativas no peso entre animais íntegros e desnervados. DING *et al.*(2011) também relatam os mesmos achados em coelhos, corroborando com os achados deste

trabalho. Podemos concluir que os mecanismos envolvidos na atividade do CC não apresentam influência direta na manutenção de peso corporal.

Contrastando com o descrito na literatura para animais desnervados, a perda de peso foi evidente nos grupos que receberam DOX, independentemente da desnervação. Esta redução no peso deve-se ao fato da toxicidade não ser exclusivamente cardíaca; lesões hepáticas e renais estão presentes, associadas à redução do consumo de água e comida (MERLET *et al.*, 2013). Experiências prévias do nosso laboratório (dados não publicados) relatam redução no consumo de água e comida de até 80% em ratos durante a fase de indução de IC.

Apesar da inexistência de dados na literatura sobre o comportamento do peso corporal em animais previamente quimiodesnervados e desafiados a DOX, podemos notar que a desnervação não favoreceu os animais, pois a redução de peso no grupo DDOX foi similar ao do grupo CDOX, indicando assim, que o CC parece não influenciar a perda de peso associada aos efeitos tóxicos da DOX.

6.2 – HEMODINÂMICA

A influência simpatotônica que os CC exercem na pressão arterial foi relatada por FRANCHINI e KRIEGER(1992). Após acompanharem por vinte dias a pressão arterial média de ratos submetidos a desnervação sinusal, os pesquisadores constataram que houve redução de aproximadamente 10mmHg na PAM, sem alteração na FC. Esta queda da pressão deve-se à queda da atividade simpática periférica conforme relatado por IRIGOYEN.*et al.*(1991).

Ainda, na caracterização hemodinâmica de animais quimiodesnervados, FRANCHINI e KRIEGER(1992). relatam que a desnervação não influenciou na FC pelo fato de não haver alterações em relação ao grupo controle. Nossos dados divergem desses, uma vez que os grupos desnervados apresentaram redução dos valores de PA em relação aos seus controles. Além desta divergência na resposta da PA, nós encontramos aumento significativo da FC no grupo DSAL. Este aumento não pode ser atribuído a uma desnervação incompleta, uma vez que a redução da resposta pressórica nos animais desnervados, quando desafiados pelo KCN, comprova a efetividade da desnervação do CC. Desta forma, podemos atribuir a discrepância encontrada da PAM e FC a questões relacionadas ao registro, pois está bem reconhecido que o registro de sinais em animais acordados (como foi realizado no estudo citado) pode sofrer influência do ambiente e levar ao estresse do animal. Outra evidência de que isto pode ter ocorrido refere-se à desnervação sinoaórtica (desnervação das aferênciasquímio e barorreceptoras) que levava a uma hipertensão neurogênica no rato (KRIEGER, 1964) e não se manteve quando os polígrafos digitais permitiram manter os registros de animais em ambientes controlados e por longo tempo.

Embora a PA suba agudamente quando se realiza esse procedimento, ela não se sustenta elevada após alguns dias. (FRANCHINI e KRIEGER, 1996). E mais, o retorno da PA aos valores de normalidade nessa fase crônica tem sido atribuído à quimiodesnervação, com consequente queda da atividade simpática periférica e da PA (IRIGOYEN *et al*, 1991; IRIGOYEN *et al*, 1995).

Quanto ao comportamento hemodinâmico nos animais tratados com DOX, esperávamos redução da PAS, PAM, PAD e FC em relação ao grupo tratado com salina, como já demonstrado pela nossa equipe (IRIGOYEN *et al*, 2001). Porém, os valores pressóricos dos animais tratados com Dox aumentaram em relação aos animais que

receberam salina. É possível que essas alterações se devam ao modelo usado de indução de IC em cada um desses momentos. Embora em tese, seja o mesmo modelo (mesma droga e mesma dose acumulativa de DOX), sabe-se que a frequência do tratamento bem como o tempo total para administração da dose podem levar a resultados diferentes. Desta forma, podemos supor que os animais tratados com DOX no presente estudo encontram-se em um estado hemodinâmico compensatório, no qual deve ocorrer aumento da atividade simpática associada à redução da sensibilidade barorreflexa, como demonstrado pela diminuição da resposta bradicárdica, aumento do balanço autonômico e da banda de alta frequência (evidenciada pela elevação de LF% e LF(nu)) e redução de HF%. Em outras palavras, o aumento da modulação simpática nos animais tratados com DOX parece ser importante nessa fase do curso temporal de desenvolvimento da IC para manter os valores de PA. Outros estudos, com um acompanhamento dos animais por mais tempo, poderão testar esta hipótese.

6.3 – SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

A insuficiência cardíaca é acompanhada pela hiperatividade simpática em determinada fase de seu curso temporal. À medida que ocorre a queda do débito cardíaco, a atividade simpática aumenta como resposta fisiológica compensatória; a longo prazo, entretanto, a manutenção de sua exacerbação se torna deletéria e contribuiu para um prognóstico ruim (KINUGAWA & DIBNER-DUNLAP, 1995; KISHI & HIROOKA, 2012). Acredita-se que um dos mecanismos envolvidos neste aumento progressivo da atividade simpática periférica é a atenuação da sensibilidade do reflexo comandado pelos barorreceptores arteriais. A função desse reflexo é manter uma inibição tônica da atividade simpática periférica, modulando-a de acordo com as variações da PA (IRIGOYEN &

KRIEGER, 1988). Em diferentes circunstâncias fisiológicas ou fisiopatológicas pode haver redução da eficiência deste sistema e é exatamente o que se esperaria em face de um quadro de IC. É esse reflexo, comandado pelos barorreceptores, a via mais rápida para controlar a hiperatividade simpática, pois sua atuação no sistema nervoso autônomo inibe tonicamente o simpático, estimulando também o parassimpático (MCCUBBIN *et al.*, 1956; KRIEGER., 1970).

De forma similar ao relatado sobre o comportamento do peso corporal em relação a desnervação carotídea, poucas são as referências na literatura que relacionam apenas o papel da desnervação do corpúsculo carotídeo com a sensibilidade barorreflexa. Nosso experimento demonstrou que a desnervação carotídea não interferiu significativamente na resposta taquicárdica e bradicárdica, indicando que a função barorreflexa estava patente. Quanto a sensibilidade barorreflexa nos animais desafiados a DOX, experiência prévia do nosso laboratório não encontrou alterações na sensibilidade barorreflexa, porém conseguiu estabelecer uma relação negativa entre a produção de marcadores de estresse oxidativo, sabidamente envolvidos nas lesões cardíacas associadas à DOX, e a redução da sensibilidade do reflexo barorreceptor (RABELO & IRIGOYEN *et al.*, 2001). Neste projeto, não demonstramos alterações na resposta taquicárdica, mas evidenciou-se redução importante na resposta bradicárdica. Levando em consideração que o teste de sensibilidade barorreflexa ocorreu aproximadamente 15 dias após a última administração de Dox, podemos concluir que a diminuição da sensibilidade barorreflexa é uma real consequência do tratamento com DOX.

Nossos dados não apontaram qualquer efeito adicional da desnervação na sensibilidade barorreflexa em animais tratados com Dox. As respostas taquicárdicas e bradicárdicas foram semelhantes no grupo DDOX e CDOX, demonstrando que a desnervação carotídea não foi capaz de melhorar a sensibilidade barorreceptora.

Curiosamente, nossos dados confrontam com os relatados por PONIKOWSKI *et al.* (2017) ao demonstrar melhora da sensibilidade barorreflexa em humanos portadores de IC após o bloqueio do quimiorreflexo temporário. Uma possível causa para a discordância dos resultados aqui obtidos com aqueles publicados por Ponikwski e colaboradores pode estar relacionada às etiologias das IC descritas, já que a IC por cardiotoxicidade não é citada.

6.4 – QUIMIORREFLEXO

As respostas hemodinâmicas oriundas da ativação dos quimiorreceptores foram descritas por FRANCHINI *et al.*, (1996), mostrando que o quimiorreflexo pode ser iniciado por meio da administração de KCN via endovenosa, levando à uma hipóxia citotóxica e assim estimulando as células quimiossensíveis do CC. As respostas pressóricas oriundas da estimulação do CC ocorrem em duas fases: a primeira, predominantemente parassimpática, resulta em bradicardia e queda da pressão arterial, e a segunda, predominantemente simpática, resulta no brusco aumento da pressão arterial. Esse aumento da PA pode ser resultado também de ativação do simpático via barorreflexo em resposta à queda de pressão arterial bem como ao aumento da atividade simpática após estimulação central por meio de vias eferentes da região ventro-látero-rostral do bulbo.

Franchini e colaboradores (1997) relatam que a administração de 30ug/kg de KCN foi capaz de aumentar a PAM em aproximadamente 50mmHg e reduzir a FC em 245bpm. Esse teste foi usado para: 1) a comprovação da desnervação carotídea, quando não observarmos essa resposta em presença da administração de substâncias que excitam os quimiorreceptores; 2) a avaliação da sensibilidade do CC pode ser aferida através da administração de doses escalonadas de KCN, estabelecendo-se um padrão de respostas. O nosso experimento não avaliou o comportamento da FC, mas apenas a resposta pressórica

induzida pela administração de KCN. Esta abordagem permitiu comprovar a eficiência da desnervação pela ausência da resposta pressórica após a administração de duas doses diferentes de KCN nos animais desnervados.

Os nossos resultados corroboraram com os descritos por Franchini e colaboradores (1997) quanto à variação da PA no grupo CSAL desafiados ao KCN. Já os animais submetidos a desnervação prévia do CC apresentaram significativa redução da resposta pressora, como esperado. Porém, os animais tratados com Dox apresentaram também uma redução das respostas pressóricas quando comparados aos animais controles, porém menos acentuada do que no grupo denervado. Este fenômeno pode estar relacionado a uma atenuação da quimiossensibilidade comandada pelo CC.

Quanto à redução da sensibilidade do CC, apesar da escassez de dados na literatura, os resultados da avaliação da frequência respiratória (não descritos nessa Dissertação uma vez que há análises ainda em andamento) nos ajudam a compreender que esta diminuição pode estar relacionada à uma grande atividade dos quimiorreceptores com provável saturação, pois os animais CDOX apresentaram aumento significativo da frequência respiratória em relação aos animais CSAL ($CDOX = 96 \pm 6$ x $DDOX = 58 \pm 2$ mrpm, $*p < 0,01$). Quanto a resposta quimiorreflexa no grupo DDOX, a ausência de dados na literatura nos impede a formulação de conclusões sobre o efeito associado da desnervação prévia ao tratamento da Dox no sistema cardiovascular.

6.5 – CONTROLE AUTONÔMICO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO E DA FREQUÊNCIA

Atualmente muito se tem discutido sobre a retirada dos CC como tratamento para os portadores de IC visando a redução da disautonomia, como citado por, DEL RIO *et al.*,

(2013) e PONIKOWSKI *et al.* (2017). Levando em consideração o efeito simpatotônico comandado pelo CC, ao realizarmos a desnervação bilateral crônica a nossa expectativa era de uma redução da modulação simpática caracterizada por alterações da variabilidade do IP, redução na banda LF, acompanhada ou não da banda de HF, e por fim, redução no balanço autonômico.

Ao término do nosso experimento, nossos dados demonstraram redução no IP nos grupos CDOX, DSAL e DDOX comparados ao controle (CSAL). As possíveis justificativas são as mesmas para a FC acima discutidas; desta forma, a VFC no domínio do tempo não evidenciou diferenças significativas em relação ao grupo controle. No domínio da frequência, embora não tenham sido observadas alterações nos valores absolutos de LH e HF, o LF % e normalizado apresentaram-se maiores nos grupos tratados com DOX (CDOX e DDOX), não tendo a desnervação carotídea atenuado esse aumento. Da mesma forma, o balanço autonômico foi maior nos grupos DOX em comparação ao controle (CSAL), indicando um aumento da modulação simpática compensatória nos grupos tratados.

Esses aumentos têm sido descritos em diferentes modelos de IC, e com valores variados de LF. No entanto, a desnervação carotídea não alterou significativamente o balanço no grupo DOX, como seria esperadona nossa hipótese.

Salientando a relevância existente da manifestação disautonômica na IC, nosso modelo de IC induzida pela Dox obteve êxito em mimetizar a hiperatividade simpática e redução parassimpática. Nossos resultados demonstram que o tratamento da Dox foi capaz de diminuir a variância do IP em relação ao seu grupo controle, assim como, aumentar a banda LF evidenciado pelo aumento do LF% e LF(nu), somado a redução parassimpática evidenciada pela diminuição do HF(nu) e aumento do balanço autonômico. Nossos resultados corroboram os relatados por POTOCHNICK *et al.* (2017) ao comparar animais tratados com Dox, inclusive com dose cumulativa inferior àquela utilizada neste protocolo.

Nossos dados divergem um pouco dos relatados por DEL RIO *et al.* (2103) que demonstraram um aumento na banda do HF(nu) nos animais CDOX em relação ao seu controle; este fato pode estar associado a uma divergência de protocolo, uma vez que o protocolo de DEL RIO *et al.* (2013) é agudo. Apesar da ausência de sinais explícitos da diminuição simpática nos animais cronicamente desnervados, este procedimento em indivíduos saudáveis não oferece riscos quando avaliado pelo ponto de vista hemodinâmico e autonômico.

Vale ressaltar que a hiperatividade simpática em nosso modelo de IC é semelhante ao que acontece em pacientes humanos, pois, além de estar associada à redução da sensibilidade barorreflexa, pode também ser explicada pela disfunção diastólica sem prejuízo da FE evidenciada pelo ecocardiograma no modelo. VOSKUIL *et al.* (2015) referem-se uma nova classificação de IC, em humanos, denominada de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada que inclui pessoas portadoras de disfunção diastólica com FE preservada, correspondendo ao surgimento da hiperatividade simpática.

Nosso estudo, de forma inédita, evidenciou que a desnervação carotídea apresentou efeitos insatisfatórios nos animais tratados com Dox. Os animais DDOX apresentaram redução do desvio padrão do IP, redução importante da variância do IP e do RMSSD em relação ao grupo DSAL; assim sendo, a desnervação não foi capaz evitar o desbalanço autonômico a longo prazo ocasionado pela Dox, resultando na possibilidade de maior no risco de morrer.

A análise espectral também mostrou que a desnervação não foi eficiente para evitar a hiperatividade simpática produzida pela Dox, por não haver diferença entre o grupo DDOX e CDOX na banda de LF% e LF(nu). Além de não impedir a hiperatividade simpática, a

desnervação não impediu a redução parassimpática induzida pela Dox quando avaliada a banda de HF do grupo DDOX em relação ao CDOX.

A influência benéfica da desnervação no controle autonômico da frequência cardíaca relatada em humanos portadores de IC, não aconteceu no nosso modelo, o que pode estar relacionado à toxicidade sistêmica da Dox, que pode ser tão lesiva para o animal de modo a impedir os benefícios que a desnervação poderia oferecer.

6.6 – CONTROLE AUTONÔMICO DA PRESSÃO ARTERIAL.

A escassez de dados sobre o efeito autonômico periférico da PA decorrente da desnervação carotídea em humanos e animais tratados com DOX limita a discussão dos dados. Nosso estudo mostrou que a PAS não foi diferente entre os grupos experimentais; este resultado pode estar relacionado a mecanismos compensatórios discutidos no item 6.1.2. De fato, considerando apenas o efeito da desnervação carotídea em animais controle, trabalho prévio de nosso grupo (FRANCHINI & KRIEGER, 1992) mostrou que ocorre uma queda sustentada da PA que, no entanto não é acompanhada por mudanças na variabilidade da PA. Essas respostas foram observadas tanto na desnervação carotídea (que inclui desnervação das fibras aferentes barorreceptoras carotídeas somada às fibras quimiorreceptoras) como na desnervação isolada dos quimiorreceptores.

Neste trabalho, as variáveis relacionadas ao desvio padrão da PAS e a variância da PAS não foram estatisticamente diferentes, incluindo os tratados com Dox. Foi possível observar que apenas o grupo DSAL apresentou aumento da banda de LF. De fato, a modulação simpática periférica da PAS apresentou aumento significativo apenas nos animais DSAL, sendo esse resultado o oposto do esperado.

6.7 – AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL CARDÍACA

Tendo em vista o crescimento de trabalhos que relacionam a desnervação carotídea com a melhora de pacientes com IC, é de suma importância compreender as influências morfofuncionais que o procedimento de desnervação pode ocasionar no coração. Apesar da falta de trabalhos na literatura relacionando exclusivamente o papel do corpúsculo carotídeo na morfologia e função cardíaca, nosso estudo evidencia, por meio de avaliações ecocardiográficas, que a desnervação crônica por si só não alterou a morfologia cardíaca. Resultados similares foram encontrados quanto à função sistólica e diastólica que permaneceram inalteradas nos animais desnervados em relação ao grupo CSAL.

Já as lesões cardíacas ocasionadas pela cardiotoxicidade da DOX repercutiram na morfologia e função diastólica. O ecocardiograma mostrou alterações morfológicas diastólicas pela redução do seu volume, diâmetro e parede posterior. Entretanto as alterações sistólicas se limitaram à redução do septo na sístole. Estas alterações morfológicas são resultantes da morte de cardiomiócitos que se refletem na redução significativa do peso bruto cardíaco e ventricular. Ainda quanto a avaliação morfológica, nosso trabalho mostrou que a Dox diminuiu a relação aorta/átrio esquerdo, o que implica redução das dimensões do átrio esquerdo, fato este que realça o potencial da Dox de causar intensa morte de cardiomiócitos.

A avaliação da função cardíaca evidencia disfunção diastólica devido à redução na relação das ondas E'/A' e aumento na relação das ondas E/E' , estes dados indicam redução da participação ventricular na fase rápida do preenchimento ventricular, e consequentemente, maior participação do átrio na fase lenta de preenchimento ventricular. Vale salientar que a relação das ondas E/A não estão alteradas, caracterizando a presente disfunção diastólica como pseudonormal, conforme consta na “Diretriz para Indicações e Utilização da

Ecocardiografia na Prática Clínica” da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Levando em consideração a disfunção diastólica, com manutenção da FE, vale lembrar que o nosso modelo foi capaz de mimetizar um quadro de ICFEP, classificação feita pela American College of Cardiology Foundation e American Heart Association aos pacientes humanos com IC mas portadores de disfunções diastólicas com fração de ejeção preservada.

Quanto aos achados morfofuncionais induzidos pela Dox, nossos dados corroboram em parte com os descritos por O’CONNELL et al. (2017) e SINGAL et al. (2017). Experiências prévias do nosso laboratório nos levam a concluir que as discrepâncias morfológicas e/ou funcionais encontradas nos trabalhos dos autores acima citados em relação aos nossos podem estar relacionadas com a droga, via de administração, protocolo de indução e tempo de observação.

Apesar da ausência de dados na literatura a respeito das alterações morfofuncionais induzidas pela associação de Dox e desnervação carotídea, nosso trabalho conseguiu evidenciar que a desnervação não apresentou qualquer efeito aditivo na morfologia diastólica e sistólica em animais desafiados a Dox em comparação ao seu controle. Porém, a retirada dos CC nos animais tratados com Dox, revelou piora na função diastólica caracterizada pelo aumento do TRIV em relação ao grupo DSAL e aumento da relação E/E’ quando comparado a todos os grupos. De forma semelhante ao observado com a disfunção diastólica, houve piora da função sistólica através da redução da FE e FAC em relação ao grupo CSAL e DSAL, fatores estes inalterados nos grupos CDOX.

Além disso, é possível que no curso temporal do desenvolvimento da IC pela DOX no protocolo utilizado para este estudo, a atividade simpática periférica esteja contribuindo de forma marcante para a manutenção da FE e da função cardíaca dentro de parâmetros de normalidade. Assim, a retirada do estímulo simpático por desnervação dos aferentes

quimiorreceptores pode ter afetado negativamente a manutenção do estado de compensação fisiológica após tratamento com Dox.

6.8 – PESO DOS ÓRGÃOS

Os diversos efeitos celulares que a DOX causa nos cardiomiócitos culminam em morte celular, a intensidade da lesão cardíaca reflete diretamente no peso total e ventricular do coração. Em contrapartida, o efeito que a desnervação do CC pode causar nos cardiomiócitos requer mais estudos, porém dados deste experimento indicam que a desnervação não foi capaz de alterar o peso total do coração ou dos ventrículos. Porém, o grupo CDOX, como esperado, apresentou redução de 40% do peso cardíaco em relação ao grupo CSAL. A mesma redução pode ser notada no peso dos ventrículos, sendo que nossos dados corroboram com os encontrados por O'CONNELL *et al.*(2017) e SINGAL *et al.*(2017).

Dados deste projeto mostram que a desnervação não impediu a perda de peso bruto do coração e ventrículo em relação aos seus controles. Similar ao efeito que a desnervação exerceu sobre peso cardíaco e ventricular, o mesmo ocorreu sobre o peso pulmonar. Curiosamente a DOX foi capaz de induzir a perda de peso pulmonar, independente da desnervação prévia. Apesar da escassez de dados na literatura sobre os impactos da Dox no pulmão, o resultado esperado era o aumento do peso pulmonar decorrente de possível congestão, mas causas fibróticas devem ser levadas em consideração na redução do peso pulmonar.

6.9 – MORTALIDADE

A comparação da mortalidade entre os diferentes grupos não apresentou, discordando com o relatado por O'CONNELL *et al.*, (2017) e SINGAL *et al.*, (2017). Porém a discordância de resultados pode estar associada à diferença no período de observação sendo o deste projeto menor em relação ao dos autores citados.

7.0 – CONCLUSÃO

Após a análise e discussão de todos os dados, podemos concluir que a Dox, no protocolo utilizado no presente estudo, obteve êxito na indução de um quadro de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada. Apesar da desnervação do CC não apresentar complicações hemodinâmicas, autonômicas e morfofuncionais, podemos concluir também que o procedimento de desnervação não proporcionou efeitos benéficos frente a IC induzida pela DOX, corroborando com a piora das disfunções sistólicas e diastólicas. Tais achados sugerem cautela na indicação do procedimento de desnervação do CC no manejo da IC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, A. P., F. D. McBryde, et al. (2012). "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat." *J Physiol* **590**(17): 4269-4277.
- Albuquerque, D. C., J. D. Souza Neto, et al. (2015). "I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes." *Arq Bras Cardiol*.
- Arozal, W., K. Watanabe, et al. (2010). "Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats." *Toxicology* **274**(1-3): 18-26.
- Bagrov, A. Y., J. I. Shapiro, et al. (2009). "Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets." *Pharmacol Rev* **61**(1): 9-38.
- Bax et al, (2011). "Cardiac autonomic nervous system in heart failure: imaging technique and clinical implications." *Curr Cardiol Rev* **7**(1): 35-42

- Cardinale, D., A. Colombo, et al. (2010). "Anthracycline-induced cardiomyopathy: clinical relevance and response to pharmacologic therapy." J Am Coll Cardiol**55**(3): 213-220.
- Carll, A. P., M. S. Willis, et al. (2011). "Merits of non-invasive rat models of left ventricular heart failure." Cardiovasc Toxicol**11**(2): 91-112.
- Chatterjee, N. A. and J. P. Singh (2015). "Novel Interventional Therapies to Modulate the Autonomic Tone in Heart Failure." JACC Heart Fail**3**(10): 786-802.
- Davis, R. C., F. D. Hobbs, et al. (2000). "ABC of heart failure. History and epidemiology." BMJ**320**(7226): 39-42.
- Del Rio, R., D. C. Andrade, et al. (2015). "Selective carotid body ablation in experimental heart failure: a new therapeutic tool to improve cardiorespiratory control." Exp Physiol**100**(2): 136-142.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." Eur J Heart Fail**10**(10): 933-989.
- Diretriz para Indicações e Utilização da Ecocardiografia na Prática Clínica (2004). Arq. Bras. Cardiol. Volume **82**(suplemento 11)
- Ding, Y., Y. L. Li, et al. (2011). "Role of blood flow in carotid body chemoreflex function in heart failure." J Physiol**589**(Pt 1): 245-258.
- Doroshov, J. H. (1983). "Effect of anthracycline antibiotic on oxygen radical formation in rat heart." Cancer Res**43**(2): 460-472.
- Duscha, B. D., P. C. Schulze, et al. (2008). "Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training." Heart Fail Rev**13**(1): 21-37.
- Felker, G. M., P. S. Cuculich, et al. (2006). "The Valsalva maneuver: a bedside "biomarker" for heart failure." Am J Med**119**(2): 117-122.
- Floras, J. S. (2009). "Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model." J Am Coll Cardiol**54**(5): 375-385.
- Franchini, G. K. e Krieger, E.M. (1992). "Carotid Chemoreceptors influence arterial pressure in intact aortic-denervate rats". Am. J. Physiol.**31**: 677-683.
- Franchini, G. K. e Krieger, E.M. (1996). "Alterations in the cardiovascular control by the chemoreflex and baroreflex in old rats. Am. J. Physiol. **39**. 310-313.
- Guimarães, G. V., J. F. C. Belli, et al. (2011). "Comportamento dos quimiorreflexos central e periférico na insuficiência cardíaca." Arq Bras Cardiol**96**: 161-167.
- Ho, K. K., J. L. Pinsky, et al. (1993). "The epidemiology of heart failure: the Framingham Study." J Am Coll Cardiol**22**(4 Suppl A): 6A-13A.

- Irigoyen, M.C., Krieger, E. M.(1988). Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.***21**:869-872
- Irigoyen, M.C., Krieger, E. M.(1991). Renal sympathetic nerve activity and arterial pressure relationship after selective denervation of baroreceptor and chemoreceptor. *Braz. J. Med. Biol. Res.***24**:219-222
- Irigoyen, M.C., Krieger, E. M.(1995). Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension* **26**:1111-1116.
- Irigoyen, M. C., F. M. Consolim-Colombo, et al. (2001). "Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático." *Revista Brasileira de Hipertensão***8**(1): 55-62.
- Katia De Angelis, M. D. S. B. S., Maria Claudia Irigoyen (2004). "Sistema Nervoso Autônomo e Doença Cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*.**XIII**(3): 1-7.
- Kinugawa, T. and M. E. Dibner-Dunlap (1995). "Altered vagal and sympathetic control of heart rate in left ventricular dysfunction and heart failure." *Am J Physiol***268**(2 Pt 2): R310-316.
- Kishi, T. and Y. Hirooka (2012). "Central mechanisms of abnormal sympathoexcitation in chronic heart failure." *Cardiol Res Pract***2012**: 847172.
- Kishi, T., Y. Hirooka, et al. (2004). "Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *Circulation***109**(19): 2357-2362.
- Kobayashi, M., A. Massiello, et al. (2013) "Cardiac Autonomic Nerve Stimulation in the Treatment of Heart Failure." *The Annals of Thoracic Surgery***96**(1): 339-345.
- Kumar, P. and N. R. Prabhakar (2012). "Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body." *Compr Physiol***2**(1): 141-219.
- Krieger, E. M.(1964) Neurogenic hypertension in the rat. *Circ. Res.***15**: 511-521.
- Krieger, E. M.(1970) The acute phase of neurogenic hypertension in the rat. *Experientia***26**:628-629.
- Lessa, Í. (2001). "Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil." *Rev bras hipertens***8**(4): 383-392.
- Li, Y. L., X. H. Xia, et al. (2006). "Angiotensin II enhances carotid body chemoreflex control of sympathetic outflow in chronic heart failure rabbits." *Cardiovasc Res***71**(1): 129-138.
- Loncar-Turukalo, T., M. Vasic, et al. (2015). "Heart rate dynamics in doxorubicin-induced cardiomyopathy." *Physiol Meas***36**(4): 727-739.
- Lopes, H. F., H. B. Silva, et al. (2000). "Autonomic abnormalities demonstrable in young normotensive subjects who are children of hypertensive parents." *Braz J Med Biol Res***33**(1): 51-54.

- Ludke, A. R., A. A. Al-Shudiefat, et al. (2009). "A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity." *Can J Physiol Pharmacol***87**(10): 756-763.
- McCubbin JW, Green JH, Page IH (1956) Baroreceptor function in chronic renal hypertension. *Circ Res* 4: 205-210.
- Merlet, N., Gauthier, C., et al (2013). "Increased Beta2-Adrenoceptors in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rat". *Plos One* **E 8(5)**: e64711.
- Mostarda, C., B. Rodrigues, et al. (2010). "Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality." *Clin Exp Pharmacol Physiol***37**(4): 447-452.
- Mozaffarian, D., E. J. Benjamin, et al. (2015). "Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association." *Circulation***131**(4): e29-322.
- O'Connell, J.L., Simões, M.V., et al (2017). "Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes". *Exp. and Toxic. Pathol.***69**:213-219.
- Octavia, Y., C. G. Tocchetti, et al. (2012). "Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies." *J Mol Cell Cardiol***52**(6): 1213-1225.
- Paton, J. F., P. A. Sobotka, et al. (2013). "The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases." *Hypertension***61**(1): 5-13.
- Ponikowski, P., Niewinski, P., et al (2017). "Carotid Body resection for sympathetic in systolic heart failure: results from first-in-man study". *European Journal of Heart Failure* **19**:391-400.
- Potocnik, N., Finderle, Z., et al (2017). "Cardiac autonomic modulation induced by doxorubicin in a rodent model of colorectal cancer and the influence of fullerene pretreatment". *Plos One***12**:e0182632.
- Potolsky, V.Y., Shin, M.K., et al (2014) "Carotid body denervation prevents fasting hyperglycemia during chronic intermittent hypoxia." *J Appl Physiol* 117: 765-776.
- Rabelo, E., K. De Angelis, et al. (2001). "Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure." *Hypertension***38**(3 Pt 2): 576-580.
- Ribeiro, M. J., J. F. Sacramento, et al. (2013). "Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets." *Diabetes***62**(8): 2905-2916.
- Rocca, H. P. B.-L., D. Weilenmann, et al. (1999). "Is Blood Pressure Response to the Valsalva Maneuver Related to Neurohormones, Exercise Capacity, and Clinical Findings in Heart Failure?" *Chest***116**(4): 861-867.
- Roy, A., S. Guatimosim, et al. (2014). "Cholinergic Activity as a New Target in Diseases of the Heart." *Molecular Medicine***20**(1): 527-537.

- Sabino, J. P., M. Oliveira, et al. (2013). "Hemodynamic and ventilatory response to different levels of hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated rats." CliniCsal(Sao Paulo)**68**(3): 395-399.
- Sano, N., D. Way, et al. (1990). "Renal norepinephrine spillover and baroreflex responses in evolving heart failure." Am J Physiol**258**(6 Pt 2): F1516-1522.
- Seber, A., A. S. Miachon, et al. (2013). "[First guidelines on pediatric cardio-oncology from the Brazilian Society of Cardiology]." Arq Bras Cardiol**100**(5 Suppl 1): 1-68.
- Singal, P. K. and N. Iliskovic (1998). "Doxorubicin-induced cardiomyopathy." N Engl JMed**339**(13): 900-905
- Singal, P. K. and Akolkar, G., et al (2017). "Vitamin C mitigates oxidative/nitrosative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiomyopathy." Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**313**:795-809..
- Spallarossa, P., P. Altieri, et al. (2006). "Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase." Cardiovasc Res**69**(3): 736-745.
- Tong, J., P. K. Ganguly, et al. (1991). "Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats." Am J Physiol**260**(3 Pt 2): H909-916.
- Tripodskiadis, F., G. Karayannis, et al. (2009). "The sympathetic nervous system in heart failure phys
- Voskuil, M., Verloop, W., J. (2015)" A Systematic Review Concerning the Relation between the Sympathetic Nervous System and Heart Failure with Preserved Left Ventricular Ejection Fraction". Plos One**10**(2): e0117332
- Vanderlei, L. C. M., C. M. Pastre, et al. (2009). "Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica." Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**24**: 205-217.
- Wang, W., G. Q. Zhu, et al. (2004). "Baroreceptor reflex in heart failure." Sheng Li Xue Bao**56**(3): 269-281.
- Yancy, C. W., M. Jessup, et al. (2013). "2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines." Circulation**128**(16): e240-327.