



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA – TRINDADE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

Marcelo Fernandes dos Santos

Avaliação dos efeitos do aumento da atividade parassimpática induzido pelo tratamento crônico com piridostigmina sobre a fragmentação da frequência cardíaca em ratos com hipertensão arterial e insuficiência cardíaca

Florianópolis

2021

Marcelo Fernandes dos Santos

Avaliação dos efeitos do aumento da atividade parassimpática induzido pelo tratamento crônico com piridostigmina sobre a fragmentação da frequência cardíaca em ratos com hipertensão arterial e insuficiência cardíaca

Dissertação submetida ao Programa multicêntrico de pós-graduação em ciências fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em ciências fisiológicas
Orientadora: Profa. Dra. Renata Maria Lataro
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Virgílio da Silva

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Santos , Marcelo Fernandes dos

Avaliação dos efeitos do aumento da atividade parassimpática induzido pelo tratamento crônico com piridostigmina sobre a fragmentação da frequência cardíaca em ratos com hipertensão arterial e insuficiência cardíaca / Marcelo Fernandes dos Santos ; orientadora, Renata Maria Lataro, coorientador, Luiz Eduardo Virgílio da Silva, 2022.

51 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e piridostigmina. I. Lataro, Renata Maria . II. Silva, Luiz Eduardo Virgílio da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

Marcelo Fernandes dos Santos

Avaliação dos efeitos do aumento da atividade parassimpática induzido pelo tratamento crônico com piridostigmina sobre a fragmentação da frequência cardíaca em ratos com hipertensão arterial e insuficiência cardíaca

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rubens Fazan Jr (Membro Titular)

Instituição: Departamento de Fisiologia, FMRP/USP

Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Espertta (Membro Titular)

Instituição: Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB/UFSC

Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima (Membro Suplente)

Instituição: Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB/UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Espertta

Coordenação do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológica
- UFSC

Profa. Dra. Renata Maria Lataro

Orientadora

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos meus amigos e familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar durante essa longa jornada sem ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus familiares por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

À todos os meus amigos em especial a Kleverton por sempre me apoiar nas horas mais difíceis.

À minha orientadora professora Dra. Renata Maria Lataro por toda a paciência e por todo conhecimento passado. Sou muito grato pela oportunidade. Muito obrigado!

Ao meu co-orientador professor Dr. Luiz Eduardo Virgílio por toda sua colaboração por estar sempre à disposição para tirar dúvidas. Obrigado por tudo!

À todos os meus colegas da pós-graduação em especial a Tamires, Franciele e a Sara, obrigado pelo acolhimento e por estar sempre à disposição.

Ao Igor, a Camila e aos demais colegas de LAFIC.

Agradeço a todos os professores do programa por todas as suas contribuições.

RESUMO

Recentemente foi identificado um novo biomarcador não invasivo, possivelmente associado à instabilidade sinoatrial, denominado de fragmentação da frequência cardíaca (HRF). A HRF exibe uma assinatura dinâmica distinta, caracterizada por alterações frequentes entre aceleração e desaceleração da frequência cardíaca (FC), em uma frequência de variação superior a mediada pelo tônus vagal cardíaco. Outro fator possivelmente associado ao aumento da HRF é a disfunção do sistema de controle neuro-autonômico, afetando direta e indiretamente os mecanismos de geração e condução do estímulo elétrico cardíaco. Por outro lado, alguns estudos vêm investigando o uso de terapias farmacológicas utilizando inibidores da enzima acetilcolinesterase, como a piridostigmina (PIR), como forma de aumentar o tônus parassimpático e reverter a disfunção autonômica. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos com insuficiência cardíaca (IC), os efeitos do tratamento crônico com PIR sobre a HRF. Os animais foram divididos em 2 estudos. O estudo I foi composto por: WKY (n= 9), SHR (n= 6) e SHR+PIR (n= 5). Foram implantadas minibombas osmóticas subcutâneas entre as escápulas para administração de PIR por 16 semanas. O estudo II foi composto por: SHAM (n= 5), IC (n= 6) e IC+PIR (n= 7). Neste caso, a PIR foi administrada na água de beber por 4 semanas. Ao final do tratamento os animais foram submetidos à cirurgia de canulação, para posterior registro de pressão arterial. Os registros foram realizados em ratos acordados em condições basais e, também, após o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina. As séries de intervalos cardíacos foram analisadas, e os seguintes índices de HRF foram calculados: a porcentagem geral de pontos de inflexão (PIP), a porcentagem de padrões com zero (W_0), um (W_1), dois (W_2) e três (W_3) pontos de inflexão e a porcentagem de padrões com apenas pontos de inflexão fortes (W^H), suaves (W^S) e mistos (W^M). Além disso, foram avaliadas as correlações entre o tono parassimpático e a sensibilidade espontânea do barorreflexo e os índices de HRF. Os resultados mostraram um aumento na porcentagem de padrões W_0 e uma diminuição de W^H nos SHR e SHR+PIR. No estudo II, os ratos IC e IC+PIR apresentaram um aumento na porcentagem de padrões W^H e uma diminuição de W^M comparado aos ratos SHAM. Os ratos IC+PIR também apresentaram um aumento na porcentagem de padrões W^H e uma diminuição de W^M comparado aos ratos IC. Além disso, observou-se uma diminuição da porcentagem de padrões W^S apenas nos ratos IC+PIR. As análises de correlações mostraram que o tono parassimpático cardíaco, os índices de HRF e do barorreflexo não se correlacionam. Assim, os nossos dados fornecem evidência de que o aumento do tono parassimpático induzido pela PIR não promoveu alterações na HRF nos SHR. Na IC, ambos os grupos tratados e não tratados com PIR exibiram um aumento da densidade dos pontos de inflexão W^H e uma diminuição de W^S , embora esses valores tenham sido maiores nos animais tratados; entretanto, quando correlacionado ao tônus parassimpático, os índices de HRF não apresentaram uma correlação significativa, sugerindo que outros fatores estejam envolvidos na gênese da HRF. Portanto, conclui-se que o tratamento com PIR não foi eficiente em diminuir a HRF nos SHR e nos ratos com IC.

Palavras-chave: Hipertensão arterial. Insuficiência cardíaca. Estimulação vagal. Variabilidade da frequência cardíaca. Tono Parassimpático

ABSTRACT

A new non-invasive biomarker, possibly associated with sinoatrial instability, called heart rate fragmentation (HRF) has been recently identified. HRF exhibits a distinct dynamic signature, characterized by frequent changes between acceleration and deceleration of heart rate (HR), at a frequency of variation greater than that mediated by cardiac vagal tone. Another factor possibly associated with the increase in HRF is the dysfunction of the neuro-autonomic control system, which affects, directly and indirectly, the mechanisms of generation and conduction of the cardiac electrical stimulus. On the other hand, some studies have been investigating the use of acetylcholinesterase enzyme inhibitors, such as pyridostigmine (PIR), as a tool to increase parasympathetic tone and reverse autonomic dysfunction. Thus, the present study aimed to evaluate, in spontaneously hypertensive rats (SHR) and rats with heart failure (HF), the effects of chronic treatment with PIR on HRF. Animals were divided into 2 studies. Study I was composed by: WKY (n=9), SHR (n=6) and SHR+PIR (n=5). Subcutaneous osmotic minipumps were implanted between the scapulae for PIR administration for 16 weeks. Study II was composed by: SHAM (n=5), IC (n=6) and IC+PIR (n=7). In this case, PIR was administered in drinking water for 4 weeks. At the end of treatment, the animals underwent cannulation surgery for blood pressure (BP) recording. Recordings were performed in awake rats under basal conditions and after muscarinic receptors blockade with atropine. The cardiac interval series were analyzed, and the following HRF indices were calculated: the overall percentage of inflection points (PIP), the percentage of patterns with zero (W_0), one (W_1), two (W_2) and three (W_3) inflection points and the percentage of patterns with only strong (W^H), soft (W^S) and mixed (W^M) inflection points. In addition, correlations between parasympathetic tone and spontaneous baroreflex sensitivity and HRF indices were evaluated. The results showed an increase in the percentage of W_0 standards and a decrease in W^H in SHR and SHR+PIR. In study II, IC and IC+PIR rats showed an increase in the percentage of W^H standards and a decrease in W^M compared to SHAM rats. IC+PIR rats also showed an increase in the percentage of W^H standards and a decrease in W^M compared to IC rats. Furthermore, a decrease in the percentage of W^S patterns was observed only in IC+PIR rats. Correlation analyzes showed that cardiac parasympathetic tone, HRF, and baroreflex indices do not correlate. Thus, our data provide evidence that PIR-induced increase in parasympathetic tone did not promote changes in HRF in SHR. In HF, both groups treated and not treated with PIR exhibited an increased in the density of the W^H inflection points and a decrease in W^S , although these values were higher in treated animals, however, when correlated the parasympathetic tone and the HRF indexes, both did not show a correlation, suggesting that other factors are involved in the genesis of HRF. Therefore, it is concluded that PIR treatment was not efficient in decreasing the HRF in SHR and rats with HF.

Keywords: Arterial hypertension. Heart failure. Vagal stimulation. Heart rate variability. Parasympathetic tone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Registro representativo de sinais de pressão arterial pulsátil e eletrocardiograma ilustrando sequências barorreflexas <i>up</i> e <i>down</i>	22
Figura 2 – Exemplos de arritmia sinusal respiratória e ritmo sinusal fragmentado.....	25
Figura 3 – Cálculo dos padrões simbólicos de HRF.....	26
Figura 4 – Variações do RMSSD e PIP com o avanço da idade.....	27
Figura 5 – Valores de PIP de ratos WKY, SHR e SHR+PIR.....	34
Figura 6 – Valores de W_0 , W_1 , W_2 e W_3 de ratos WKY, SHR e SHR+PIR.....	35
Figura 7 – Valores de W^M , W^S e W^H de ratos WKY, SHR e SHR+PIR	36
Figura 8 – Correlação entre os índices de HRF, SBR e tono parassimpático de ratos WKY, SHR e SHR+PIR	37
Figura 9 – Valores de PIP de ratos SHAM, IC e IC+PIR	38
Figura 10 – Valores de W_0 , W_1 , W_2 e W_3 de ratos SHAM, IC e IC+PIR.....	39
Figura 11 – Valores de W^M , W^S e W^H de ratos SHAM, IC e IC+PIR	40
Figura 12 – Correlação entre os índices de HRF, SBR e tono parassimpático de ratos SHAM, IC e IC+PIR	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BEI - Índice de efetividade do barorreflexo
- DC - Doenças cardiovasculares
- FC - Frequência cardíaca
- GABA - Ácido gama-aminobutírico
- HA - Hipertensão arterial
- HF – Alta frequência
- HRF - Fragmentação da frequência cardíaca
- IC - Insuficiência cardíaca
- IM - Infarto do miocárdio
- LF - Baixa frequência
- NN50 - Número de diferenças entre intervalos RR normais consecutivos superiores a 50 milissegundos
- PA - Pressão arterial
- PAS - Pressão arterial sistólica
- PIP – Porcentagem geral de pontos de inflexão
- PIR – Piridostigmina
- PNN50 - Porcentagem de intervalos RR normais adjacentes com diferença de duração maior que 50 milissegundos
- PVN - Núcleo paraventricular hipotalâmico
- RMSSD - Raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos RR consecutivos elevados ao quadrado
- RR – Intervalos entre sucessivas ondas R
- SBR - Sensibilidade espontânea do barorreflexo
- SDNN - Desvio padrão da média de intervalos RR normais
- SHR - Ratos espontaneamente hipertensos
- SNA - Sistema nervoso autonômico
- VFC - Variabilidade da frequência cardíaca
- VLF - Muito baixa frequência
- W0 – Porcentagem de palavras com zero ponto de inflexão
- W1 – Porcentagem de palavras com um ponto de inflexão
- W2 – Porcentagem de palavras com dois pontos de inflexão

W3 - Porcentagem de palavras com três pontos de inflexão

WH - Porcentagem de palavras com apenas pontos de inflexão forte

WKY – Wistar–Kyoto

WM - Porcentagem de palavras com pontos de inflexão mistos

WS - Porcentagem de palavras com apenas pontos de inflexão Suave

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL	15
1.2 MODELO DE HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA EM RATOS (SHR).....	16
1.3 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	17
1.4 MODELO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA PELO INFARTO DO MIOCÁRDIO NO RATO	18
1.5 DISFUNÇÃO AUTONÔMICA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	19
1.6 SENSIBILIDADE ESPONTÂNEA DO BARORREFLEXO.....	21
1.7 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	22
1.8 JUSTIFICATIVA	27
2 OBJETIVO GERAL	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATÉRIAS E MÉTODOS	29
3.1 ADMINISTRAÇÃO DA PIRIDOSTIGMINA, REGISTRO DA PA E ANÁLISE do TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO EM WKY E SHR.....	30
3.2 INDUÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	31
3.3 ADMINISTRAÇÃO DE PIRIDOSTIGMINA, REGISTRO DA PA E ANÁLISE DO TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO EM RATOS SHAM E COM IC.....	31
3.4 ANÁLISE FRAGMENTAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	32
3.5 MÉTODO DA SEQUÊNCIA	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4 RESULTADOS	34
4.1 ÍNDICES DE HRF NA HIPERTENSÃO ARTERIAL	34
4.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES HRF, BRARORREFLEXO E O TONO	

PARASSIMPÁTICO CARDÍACO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	36
4.3 ÍNDICES DE HRF NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	38
4.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES DE HRF, BARORREFLEXO E O TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	40
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial (HA) é um problema de saúde grave que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Trata-se de uma condição fisiopatológica assintomática, diagnosticada com valores pressóricos $\geq 140/90$ mmHg (YUGAR-TOLEDO et al., 2020). Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção dessa doença dentre eles, débito cardíaco aumentado, resistência vascular periférica elevada ou uma combinação de ambos, sendo que, cada um desses mecanismos é regulado por processos hemodinâmicos, neurais, hormonais e renais, os quais variam em sua contribuição de um indivíduo para outro (SAXENA; ALI; SAXENA, 2018). Embora a HA seja uma doença bem estabelecida, a sua etiologia não foi totalmente elucidada. Por se tratar de uma condição multifatorial acredita-se que sua gênese possa ser influenciada por uma série de fatores genéticos, ambientais e sociais (SAXENA; ALI; SAXENA, 2018). Quando não diagnosticada precocemente, a HA pode progredir para alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo, como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos (YUGAR-TOLEDO et al., 2020). Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo sofram dessa doença (YUGAR-TOLEDO et al., 2020).

Na tentativa de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular associadas à HA novas estratégias vêm sendo adotadas. O tratamento anti-hipertensivo é constituído por duas frentes: o tratamento não farmacológico e tratamento medicamentoso (MANN; ABRAHAM, 2019). O tratamento não farmacológico envolve uma série de mudanças no estilo de vida, como por exemplo, a redução do consumo excessivo de bebidas alcoólicas e redução do uso do tabaco, a adoção de um plano alimentar saudável rico em frutas, hortaliças, cereais integrais e peixes, assim, como a adesão a um programa de treinamento físico estruturado (DE CASTRO et al., 2020). Para algumas pessoas essas mudanças no estilo de vida são suficientes para controlar a pressão arterial (PA), reduzindo a necessidade do uso de medicamentos anti-hipertensivos ou aumentando a sua eficácia (DE CASTRO et al., 2020). No tratamento medicamentoso várias estratégias podem ser implementadas; por exemplo, o tratamento pode ser iniciado com apenas um único agente anti-hipertensivo e ao longo do tratamento podem ser inseridos outros medicamentos (RYSZ et al., 2020). Os principais medicamentos anti-hipertensivos utilizados no tratamento da HA são constituídos por: inibidores da enzima de

conversão da angiotensina, bloqueadores do receptor da angiotensina II subtipo 1, bloqueadores dos canais de cálcio de ação prolongada di-hidropiridina e diuréticos do tipo tiazida (RYSZ et al., 2020). Apesar da disponibilidade de medicamentos eficazes no tratamento da HA, cerca de 8 a 16% de todos os pacientes hipertensos no todo mundo são resistentes ao tratamento, ou seja, não conseguem atingir os níveis pressóricos recomendados (VIRANI et al., 2020). Portanto, ainda há a necessidade de buscar novas alternativas eficientes para controlar a PA em pacientes com HA.

1.2 MODELO DE HIPERTENSÃO ESPONTÂNEA EM RATOS (SHR)

Um dos modelos experimentais de hipertensão mais estudados na literatura é o SHR, devido às suas características semelhantes a hipertensão primária humana (DORIS, 2017). A produção desses animais teve início a partir da colônia Wistar-Kyoto (WKY), na Escola de Medicina da Universidade de Kyoto, no Japão, por volta de 1963 (OKAMOTO et al., 1966). Os animais surgiram do cruzamento entre irmão e irmã de ratos da linhagem WKY que possuíam uma expressiva elevação na PA; com a contínua seleção desses animais por várias gerações, foi originada a linhagem SHR (OKAMOTO et al., 1966). O SHR começa a desenvolver HA de forma espontânea a partir da 5ª semana de vida, que piora gradativamente com o envelhecimento do animal, sendo considerado como hipertenso a partir da 8ª semana de vida (DICKHOUT; LEE, 1998).

As características e a progressão da hipertensão no SHR são semelhantes a hipertensão primária humana. Por exemplo, os SHR apresentam uma reserva do fluxo coronariano reduzido, resistência vascular coronariana aumentada, função cardíaca prejudicada, disfunção endotelial, remodelamento vascular e sensibilidade espontânea do barorreflexo (SBR) reduzida (CHAPLEAU et al., 2016). Na fase pré-hipertensiva, o SHR possui débito cardíaco normal, apesar do aumento na resistência periférica total; entretanto, com o envelhecimento do animal, observa-se uma progressiva diminuição na capacidade de enchimento ventricular, decorrente de alterações estruturais e funcionais, as quais contribuem para uma diminuição do débito cardíaco por decorrência de uma IC congestiva (ZHANG et al., 2016).

Estudos clínicos e experimentais apontam que tanto pacientes hipertensos quanto

SHR apresentam hiperatividade simpática e redução da atividade parassimpática (LI et al., 2012). A hiperatividade simpática é uma característica marcante na HA (GU et al., 2020). Vários estudos vêm demonstrando que as alterações na neurotransmissão simpática contribuem para o desenvolvimento da HA nos SHR. Essas alterações são caracterizadas pelo aumento na liberação de noradrenalina no coração, acompanhada por uma redução na recaptação de noradrenalina pelo transportador pré-sináptico, resultando em um aumento da frequência cardíaca (FC) e PA média (SHANKS et al., 2013).

1.3 INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A insuficiência cardíaca (IC) é um processo decorrente de alterações na estrutura e na função cardíaca, causadas comumente por doenças isquêmicas e não isquêmicas, as quais contribuem para uma incapacidade do músculo cardíaco em bombear sangue para o corpo a uma taxa compatível com suas necessidades (TOSCHI-DIAS et al., 2017). Em um quadro de IC vários mecanismos são ativados com o objetivo de manter a perfusão tecidual adequada. Inicialmente, esses mecanismos são capazes de suprir as necessidades do organismo; no entanto, a ativação prolongada desses mecanismos pode promover efeitos deletérios na estrutura e função cardíaca (BOROVAC et al., 2020). A IC pode ocorrer em condições, que a função sistólica esteja deprimida (disfunção sistólica) ou com função sistólica preservada (disfunção diastólica) (FOURADOULAS; VON KÄNEL; SCHMID, 2019). Na disfunção sistólica, há uma perda considerável de miocárdios funcionais, causada comumente por doença isquêmica, mutação genética, doença valvar, dentre outras, resultando em uma contratilidade prejudicada e esvaziamento insuficiente do ventrículo (TOSCHI-DIAS et al., 2017). Por outro lado, na disfunção diastólica, a função contrátil do músculo cardíaco pode estar preservada, porém os mecanismos responsáveis pelo relaxamento e/ou enchimento ventricular estão prejudicados, por decorrência de alterações estruturais e celulares, causadas pela hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose intercelular e inflamação (PFEFFER; SHAH; BORLAUG, 2019).

Nos últimos anos, houve um grande progresso na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados à IC, o que levou ao desenvolvimento de novas terapias (MANN; ABRAHAM, 2019). Entretanto, apesar de todos os avanços sobre a sua compreensão, a taxa de mortalidade da IC ainda continua elevada (VIRANI et al., 2020). Estima-se que a síndrome de

IC acometa mais de 64,3 milhões de pessoas em todo o mundo (GROENEWEGEN et al., 2020). Desse modo, apesar dos recentes avanços na terapêutica, a IC ainda é uma síndrome que afeta milhares de pessoas em todo mundo. Portanto, ainda há uma necessidade de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na IC para o desenvolvimento de novas terapias mais eficientes.

1.4 MODELO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA INDUZIDA PELO INFARTO DO MIOCÁRDIO NO RATO

Na busca por compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na IC, modelos animais de IC são frequentemente utilizados na fase pré-clínica (CONCEIÇÃO et al., 2016). A ligadura da artéria coronária esquerda é um dos métodos mais usados na indução do infarto do miocárdio (IM) e, conseqüentemente, de IC (KAINUMA et al., 2017). Esse modelo experimental é amplamente utilizado em pesquisas para investigar as alterações na estrutura e na função cardíaca pós IM. A realização desse procedimento leva a uma diminuição do suprimento de oxigênio para o miocárdio, resultando em morte dos cardiomiócitos por isquemia prolongada; como consequência desse processo, há alterações na estrutura e função cardíaca, como por exemplo, adelgaçamento da parede, aumento nas dimensões e volumes do ventrículo esquerdo, diminuição na fração de encurtamento e fração de ejeção (LEFEBVRE et al., 2006).

Para que estejam presentes sinais típicos de IC, o tamanho do infarto deve ser superior a 39% do ventrículo esquerdo (DE VILLIERS; RILEY, 2020). Desse modo, o modelo experimental de IC por IM replica as alterações morfológicas e funcionais decorrentes do IM em humanos, assim como a sua progressão para IC (LEFEBVRE et al., 2006). Portanto, a utilização desse modelo animal de IC se justifica, possibilitando um melhor entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na IC e permitindo o desenvolvimento e avaliação de novas estratégias terapêuticas.

1.5 DISFUNÇÃO AUTONÔMICA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

O sistema nervoso autonômico (SNA) desempenha um papel crucial na regulação da função cardiovascular, utilizando informações de feedback instantâneo, momento a momento, para a regulação da PA (BENARROCH, 2020). A disfunção autonômica tem sido considerada um importante mecanismo fisiopatológico subjacente ao risco de doenças cardiovasculares (DC) (BENARROCH, 2020). Estudos clínicos e experimentais relataram que a HA está intimamente relacionada a um desequilíbrio autonômico, caracterizado por um aumento da atividade simpática e uma diminuição da atividade parassimpática (CAETANO; DELGADO ALVES, 2015).

Nesse sentido, vários trabalhos vêm estudando o papel das vias neurais na gênese da HA. O núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) é uma região crucial envolvida na regulação das funções cardiovasculares e neuroendócrinas (DAMPNEY et al., 2018). A atividade simpática é criticamente regulada pela atividade de disparo dos neurônios pré-simpáticos do PVN, e a atividade desses neurônios é rigidamente regulada por entradas sinápticas inibitórias e excitatórias (DAMPNEY et al., 2018). Desse modo, alguns trabalhos têm demonstrado que em condições fisiopatológicas como a HA pode-se observar um desequilíbrio de entradas sinápticas inibitórias e excitatórias para neurônios pré-simpáticos do PVN (ZHOU et al., 2019). Este desequilíbrio sináptico é caracterizado por uma diminuição de entradas inibitórias, em decorrência da redução da liberação pré-sináptica do ácido gama-aminobutírico (GABA) ou por uma diminuição no número de receptores GABA A, assim como o aumento de entradas excitatórias glutamatérgica, que contribui de forma positiva na hiperatividade dos neurônios pré-simpáticos do PVN (ZHOU et al., 2019). Portanto, o aumento da atividade simpática gerada pela disfunção neural contribui de forma significativa no desenvolvimento e manutenção da HA.

A disfunção do SNA também está envolvida no desenvolvimento e progressão da IC, e é caracterizada, assim como na HA, por atividade simpática excessiva, acompanhado de uma atenuação da atividade parassimpática (BOROVAC et al., 2020). Porém, neste caso, a ativação do simpático surge como uma resposta compensatória que libera o neurotransmissor norepinefrina nos terminais nervosos simpáticos. Por consequência, a norepinefrina se ligará

aos receptores β_1 -adrenérgicos localizados na membrana dos miócitos cardíacos, aumentando a força de contração do músculo cardíaco (efeito inotrópico positivo), FC (efeito cronotrópico positivo) e também os receptores α_1 -adrenérgicos, promovendo a vasoconstrição periférica de grandes vasos de resistência (GRASSI; MARK; ESLER, 2015). O efeito final desta ativação simpática é o restabelecendo da perfusão tecidual e do débito cardíaco (BOROVAC et al., 2020). No entanto, se ativada cronicamente, a atividade simpática acaba infligido efeitos deletérios na estrutura e função cardíaca, levando a uma piora ainda maior da IC (BOROVAC et al., 2020). Embora a atividade parassimpática para o coração esteja diminuída em doenças como a HA e IC, pouco se sabe sobre quais áreas do cérebro estão envolvidas na disfunção parassimpática. Contudo, há evidências que indicam que tanto na HA, quanto na IC, há um aumento da neurotransmissão GABAérgica inibitória para neurônios vagais cardíacos pré-ganglionares no núcleo motor dorsal do vago e uma diminuição da neurotransmissão excitatória para neurônios vagais cardíacos pré-ganglionares no núcleo ambíguo e núcleo motor dorsal do vago (CAULEY et al., 2015).

Existem evidências consideráveis que apoiam o uso de agentes farmacológicos que inibem parcialmente a atividade simpática ou aumentam a atividade parassimpática como forma de terapia no tratamento de DC (HE et al., 2015). Estudos clínicos e experimentais apontam que a estimulação crônica do nervo vago aumenta o tônus vagal, melhorando a função cardíaca (LI et al., 2004). Como a atividade eferente do nervo vago usa a acetilcolina como neurotransmissor, pode-se esperar que fármacos que aumentam a biodisponibilidade de acetilcolina na junção neuroefetora tenham um efeito semelhante à estimulação elétrica (DESAI et al., 2011).

A piridostigmina (PIR) é um inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase, que não atravessa a barreira hematoencefálica, (LU et al., 2017). A PIR age impedindo a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase nos locais de transmissão colinérgica, o que prolonga a disponibilidade de acetilcolina nas terminações nervosas colinérgicas, aumentando a eficiência da neurotransmissão (LU et al., 2017). Neste sentido, alguns trabalhos vêm demonstrando que o tratamento com a PIR aumenta o tono parassimpático, prevenindo a disfunção autonômica cardíaca em animais com IC (LATARO et al., 2013), e HA (LATARO et al., 2015). Isso se dá, provavelmente, por meio de dois mecanismos: (i) a acetilcolina liberada dos terminais de

axônios vagais inibe a liberação de noradrenalina dos terminais do axônio simpático por meio da ativação de receptores muscarínicos (MANABE et al., 1991); (ii) a estimulação colinérgica pode reduzir a liberação de AMPc intracelular, inibindo assim a cascata de sinalização adrenérgica (MANABE et al., 1991). Portanto, a PIR aumenta a biodisponibilidade de acetilcolina na junção neural, promovendo assim tanto um aumento da ativação dos receptores muscarínicos como a supressão do impulso simpático para o coração (BARBOZA et al., 2019).

1.6 SENSIBILIDADE ESPONTÂNEA DO BARORREFLEXO

A manutenção dos níveis fisiológicos de PA é fundamental para manter o fluxo sanguíneo contínuo e adequado para os diferentes tecidos e órgãos (BENARROCH, 2020). Esse controle é realizado por meio da interação de vários sistemas interdependentes que interagem entre si, desencadeando uma resposta de curto e/ou longo prazo (WESSEL et al., 2020). Na regulação de curto prazo são ativadas vias reflexas neurais que corrigem rapidamente (segundos ou minutos) a PA. Por outro lado, o controle a longo prazo (horas ou dias) envolve diversos mecanismos de controle neural e hormonal, que agem em conjunto para ampliar a atuação dos rins no controle da PA (WESSEL et al., 2020).

O barorreflexo é um componente importante da regulação cardiovascular para manter a homeostase (WESSEL et al., 2020). A função regulatória do barorreflexo é comumente avaliada por um método que quantifica a SBR, ou seja, as mudanças cardiovasculares reflexas em resposta às alterações na PA (LAUDE et al., 2004). Várias abordagens podem ser utilizadas para a quantificação da função barorreflexa, dentre elas, o método da sequência, que utiliza séries temporais, batimento a batimento, com valores de PA sistólica (PAS) e intervalo cardíaco para análise da SBR. O método da sequência busca sequências de três ou mais valores consecutivos em que existam aumentos progressivos da PAS acompanhados por aumentos progressivos do intervalo cardíaco (sequências *up*), ou reduções progressivas da PAS, acompanhadas por reduções progressivas do intervalo cardíaco (sequências *down*) como mostra a Figura 1. Conceitualmente, uma rampa de PA pode ser definida como aumentos ou reduções progressivas da PAS.

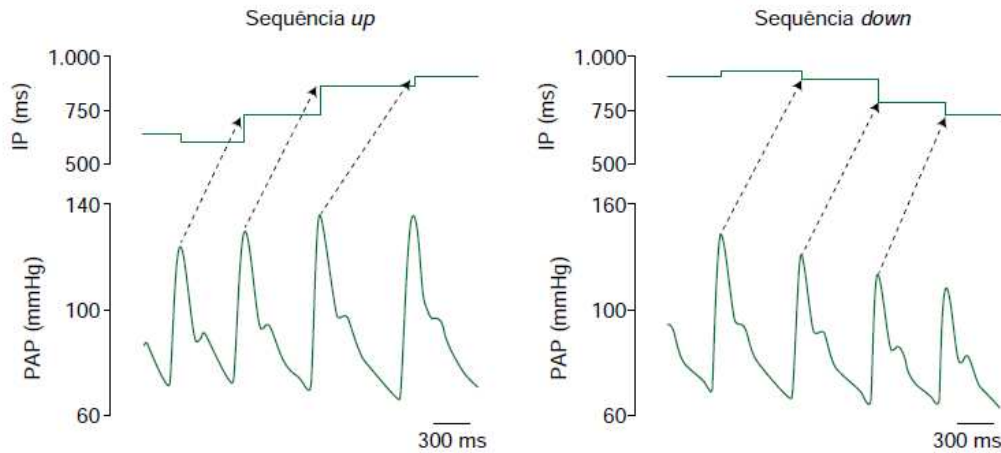


Figura 1. Registro representativo de sinais de pressão arterial pulsátil e eletrocardiograma, ilustrando sequências barorreflexas *up* e *down*. IP: intervalo de pulso; PAP: pressão arterial pulsátil. Extraído de DIAS et al., 2017.

O método da sequência permite, além do cálculo da SBR, determinar a efetividade do barorreflexo (BEI — *baroreflex effectiveness index*), ou seja, a razão entre o número total de rampas de PAS e o número de sequências barorreflexas (rampas de PA associadas a alterações reflexas do intervalo cardíaco). O BEI é um índice que reflete a quantidade de rampas de PA que efetivamente induzem respostas reflexas no intervalo cardíaco (DI RIENZO et al., 2001).

1.7 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Uma forma de avaliar a modulação autonômica cardíaca é por meio da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), uma medida indireta comumente utilizada na área de cardiologia para identificar fenômenos relacionados ao SNA (SHAFFER; GINSBERG, 2017). A VFC nada mais é que o termo utilizado para descrever as oscilações que ocorrem entre os intervalos cardíacos consecutivos (LUCINI; PAGANI, 2020).

A modulação neural do coração, simpática e parassimpática, é um dos principais fatores responsáveis pela gênese da VFC e seus padrões. Essas oscilações são naturais e esperadas, pois refletem a capacidade do coração em se adaptar a diferentes condições (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Assim, a alta VFC é um sinal de boa adaptação dos sistemas biológicos, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos homeostáticos capazes de

se adaptar às diversas situações com as quais ele se depara ao longo do dia (LUCINI; PAGANI, 2020). Inversamente, em situações patológicas, como a HA, IC e IM, há uma perda considerável da capacidade desses sistemas em se adaptar diante de situações críticas, o que é comumente descrito como perda de complexidade fisiológica (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Entretanto, alguns índices clássicos de VFC nem sempre estão consistentemente associados com alterações na complexidade fisiológica dos sistemas biológicos. Por exemplo, em algumas situações patológicas há um aumento na VFC causadas por anormalidades na condução elétrica cardíaca, e/ou do sistema de controle da FC, resultando em padrões de flutuações da FC com frequência de oscilação muito altas, superiores à mediada pelo tono parassimpático, as quais não podem ser identificadas precisamente por meio de métodos tradicionais de VFC (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a).

Em humanos vários métodos podem ser utilizados para analisar a VFC, dentre eles, estão os métodos no domínio do tempo, da frequência, e não lineares (TASKFORCE, 1996). A análise da VFC no domínio do tempo extrai características estatísticas presentes nas séries temporais de intervalos cardíacos consecutivos utilizando métodos estatísticos ou geométricos, como por exemplo: o cálculo do desvio padrão de intervalos RR normais (SDNN); raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos RR consecutivos elevados ao quadrado (RMSSD); número de diferenças entre intervalos RR normais consecutivos superiores a 50 milissegundos (NN_{50}), porcentagem de NN_{50} (PNN_{50}), entre outros (TASKFORCE, 1996). São métodos fáceis de serem implementados, porém sua implicação fisiológica não permite uma distinção clara sobre as duas divisões autonômicas simpática e parassimpática, com exceção do RMSSD e do PNN_{50} que são conhecidamente mais relacionados à modulação parassimpática (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

A análise da VFC no domínio da frequência baseia-se no cálculo da potência das oscilações presentes nas séries temporais de intervalos cardíaco (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Talvez o método mais conhecido na análise do domínio da frequência seja a análise espectral dos intervalos RR, que utiliza os espectros de frequência para identificar e quantificar os diferentes ritmos de oscilação dos intervalos RR, que são induzidas pelas duas divisões autonômicas simpáticas e parassimpáticas (TASKFORCE, 1996). Em humanos, as principais bandas de frequências estudadas em um espectro de séries RR são: a) oscilações rápidas, entre 0,15 e 0,25 Hz, ou de alta frequência (HF: *high frequency*), sendo sua gênese derivada do

parassimpático; b) oscilações lentas, entre 0,05 e 0,15 Hz, ou de baixa frequência (LF: *low frequency*), tendo sua gênese derivada tanto do simpático quanto do parassimpático, com predominância do simpático; c) oscilações muito lentas, <0,05 Hz, ou oscilações de muito baixa frequência (VLF: *very low frequency*); sendo sua gênese derivada de fatores humorais, tais como óxido nítrico, fator natriurético atrial, catecolaminas e sistema renina-angiotensina (TASKFORCE, 1996).

Os métodos não lineares propostos para análise da VFC são inspirados em conceitos provenientes de áreas como física e engenharias, e geralmente fornecem informações sobre o funcionamento global do organismo (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Os sistemas biológicos do corpo humano possuem dinâmica não linear com características complexas, que possibilitam que os sistemas sejam capazes de se adaptar às diversas situações (DELLIAUX et al., 2019). Com o envelhecimento progressivo e o surgimento de DC, a integração dos sistemas fisiológicos se enfraquece, gerando perda de complexidade fisiológica e, por consequência, mudança nos padrões de VFC (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Sendo assim, os organismos saudáveis são aqueles que possuem os sistemas fisiológicos atuando em sua máxima complexidade, traduzido na plena capacidade de interação dos vários subsistemas, e isso os tornam capazes de se adaptarem às diferentes situações adversas do dia a dia (DELLIAUX et al., 2019; GOLDBERGER; PENG; LIPSITZ, 2002). Nesse sentido, muitos estudos têm utilizado os métodos não lineares na tentativa de identificar modificações e/ou prever o risco associado à diversas doenças (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Talvez os métodos mais conhecidos de dinâmica não linear sejam as medidas fractais e de entropia (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Recentemente, foi proposto um novo biomarcador de VFC denominado de fragmentação da frequência cardíaca (HRF, do inglês *Heart Rate Fragmentation*) e um conjunto de métricas estatísticas foi desenvolvido para sua quantificação (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). A HRF exibe uma assinatura dinâmica distinta, caracterizada por alterações muito frequentes entre aceleração e desaceleração da FC, em uma frequência de variação não consistente com a modulação vagal cardíaca (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). A Figura 2 ilustra esse fenômeno.

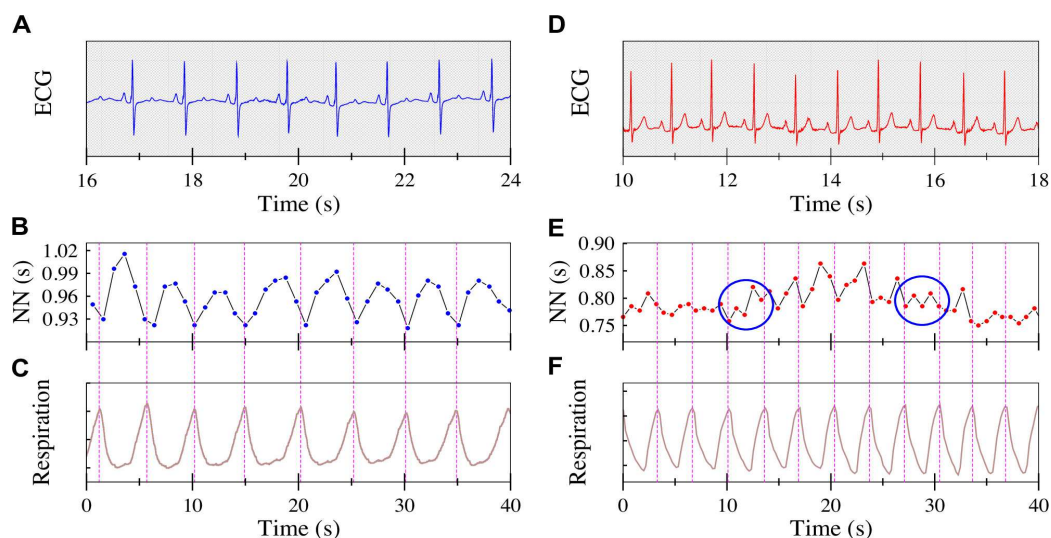


Figura 2. Exemplos de registros de ECG (linha superior, A e D), séries de intervalos RR (linha central, B e E) e registros de respiração (linha inferior, C e F). Nos gráficos do lado esquerdo são ilustrados os dados de um paciente normal; do lado direito estão os gráficos gerados de um paciente com doença arterial coronariana. Note que a arritmia sinusal respiratória do indivíduo saudável é visível na série RR (B), ao passo que as oscilações do intervalo RR no indivíduo com doença coronariana (E) possui ritmo fragmentado. Extraído de COSTA et al., 2021.

Apesar dos poucos estudos utilizando a HRF, sugere-se que o aumento da HRF está associado a uma disfunção do sistema de controle neuroautônômico-eletrofisiológico do nó sinoatrial. Em particular, a HRF aumenta à medida que os componentes da rede de cardiomiócitos e seu acoplamento fisiológico começam a se deteriorar, levando a graus crescentes de fragmentação (COSTA et al., 2018). É interessante notar que alguns índices clássicos de VFC, como por exemplo o RMSSD que está relacionado à modulação cardíaca parassimpática, são falhos em alguns casos. Por exemplo, é bem conhecido que a modulação vagal diminui com o envelhecimento (COSTA et al., 2018). Porém, vários estudos reportaram que a partir de uma certa idade, o RMSSD aumenta ao invés de diminuir, como mostra a Figura 3. Esse comportamento se deve ao fenômeno de HRF que surge em indivíduos idosos e que se sobrepõem aos fenômenos quantificados pelos RMSSD (COSTA et al., 2018).

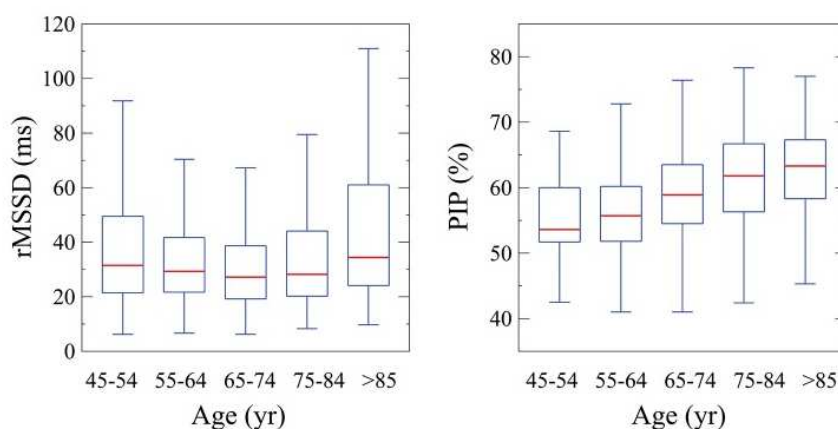


Figura 3. Variações do RMSSD e da porcentagem de pontos de inflexão (PIP, um índice de HRF) com o avanço da idade. Apesar de ser amplamente conhecido que a modulação vagal diminui com a idade, o RMSSD, considerado como um índice de modulação vagal, aumenta a partir dos 65 anos de idade (gráfico à esquerda). Porém, como mostra o gráfico à direita, a HRF (PIP) aumenta com a idade e parte desta fragmentação é incluída no cálculo do RMSSD. Extraído de COSTA, 2018.

Portanto, a presença desses padrões erráticos (fragmentados) do ritmo sinusal limita a utilidade da análise tradicional da VFC, uma vez que um aumento na VFC não pode mais ser atribuída exclusivamente à modulação autonômica aumentada (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). A abordagem simbólica para o cálculo da HRF quantifica a frequência de ocorrência de diferentes padrões de flutuações presentes nas séries RR. Inicialmente, as séries temporais de intervalo RR são mapeadas em uma sequência ternária de símbolos da seguinte forma: - 1 quando a FC está diminuindo, 0 quando FC está estável e 1 quando a FC aumenta (como mostra Figura 5). A diminuição ou aumento da FC são identificados pelas diferenças entre sucessivos intervalos RR. Posteriormente, sequências de quatro símbolos consecutivos, denominados “palavras”, são agrupadas de acordo com o número e o tipo de pontos de inflexão (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Um ponto de inflexão é identificado quando dois símbolos consecutivos são diferentes, representando uma mudança na direção da variação da FC. (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Os padrões W_0 , W_1 , W_2 e W_3 referem-se à porcentagem de padrões contendo zero, um, dois e três pontos de inflexão. Por outro lado, os padrões W^H , W^S e W^M referem-se à porcentagem de padrões contendo apenas pontos de inflexão forte, suave e de ambos os tipos (misto), independentemente da quantidade (SILVA et al., 2021).

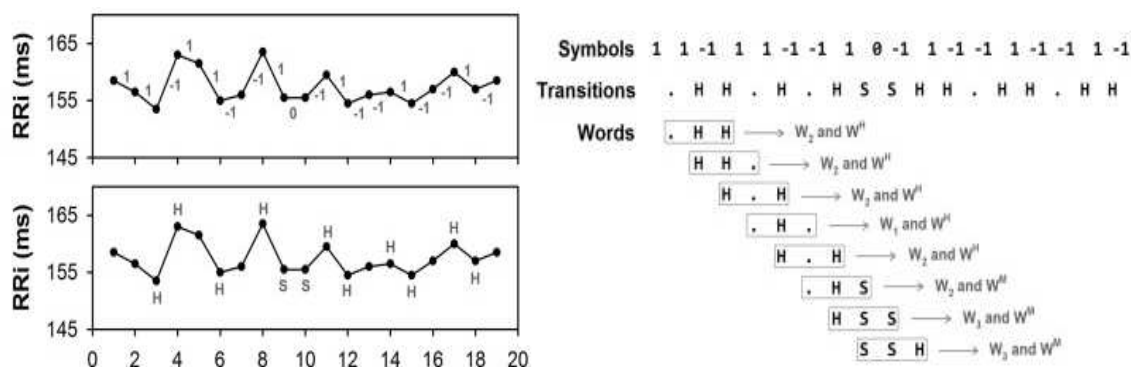


Figura 4. Cálculo dos padrões simbólicos de fragmentação da frequência cardíaca (HRF). O primeiro gráfico mostra as acelerações (símbolo “1”) e desacelerações (símbolo “-1”) da FC, representadas por variações negativas e positivas de RRi consecutivos, respectivamente. O segundo gráfico refere-se aos tipos de pontos de inflexão, que pode ser forte (H), quando ocorre uma transição entre símbolos 1 e -1 (ou vice-versa) ou suave (S), quando a transição ocorre entre um símbolo 1 ou -1 e 0 (e vice-versa). Adaptado de SILVA et al., 2021

Os mecanismos envolvidos na gênese da HRF ainda são temas de estudos; entretanto, um trabalho publicado recentemente, utilizando ratos saudáveis mostrou que após o duplo bloqueio farmacológico ou bloqueio seletivo de receptores adrenérgicos e colinérgicos cardíacos, observou-se uma diminuição da HRF, mostrando que o SNA despenha um papel crucial na gênese da HRF, direta ou indiretamente (SILVA et al., 2021). Contudo, cabe ressaltar que animais saudáveis apresentam níveis fisiológicos de controle autonômico diferentes daqueles observados em modelos experimentais de IC ou HA (ativação crônica do simpático e atenuação da atividade parassimpática) (SILVA et al., 2021). Portanto, é de suma importância a condução de novos estudos para investigar o papel da modulação autonômica na HRF nesses modelos experimentais, bem como a influência na HRF dos fármacos que atuam no sistema nervoso autônomo.

1.8 JUSTIFICATIVA

Em condições patológicas, como a HA e IC, são observadas flutuações na FC em uma frequência superior à mediada pelo nervo vago de um indivíduo saudável (STEIN et al., 2005). Até então chamado de flutuações erráticas, este fenômeno de instabilidade eletrofisiológica foi recentemente reestudado e denominado de HRF tendo sido proposto um conjunto de métricas para sua quantificação (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). Apesar de ainda pouco explorada, acredita-se que a HRF ocorra devido à quebra do sistema de controle

neuroautonômico-eletrofisiológico, produzindo um alto grau de variabilidade da FC de curto prazo, que pode ser confundido com um marcador de controle vagal quando métodos tradicionais da VFC são usados; isso leva a estimativas inflacionadas da função autonômica "saudável" em algumas populações, como idosos e pessoas com DC (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a; MAKOWIEC; WADOWCZYK, 2019). Como o controle vagal cardíaco diminui no envelhecimento e na presença de DC, espera-se que medidas classicamente atribuídas como "vagais", tais como RMSSD, PNN50 e potência espectral na banda de HF, estejam diminuídas nessas situações (COSTA et al., 2018). Entretanto, alguns trabalhos mostraram que essas medidas aumentam a partir dos ~65 anos de idade (COSTA et al., 2018), demonstrando que essas medidas são afetadas não apenas pela modulação parassimpática, possivelmente sendo influenciadas também pelo fenômeno da HRF (SILVA et al., 2021; COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). As medidas propostas para quantificar a HRF permitem discriminar a variabilidade gerada por ritmos fragmentados e não fragmentados (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Portanto, vislumbramos um grande potencial na HRF e acreditamos que essa nova abordagem pode trazer novas informações sobre a modulação autonômica e propriedades intrínsecas do nó sinusal em condições patológicas, como a HA e a IC.

Embora os mecanismos básicos da HRF ainda sejam temas de estudos, trabalhos publicados recentemente mostram que o SNA desempenha um papel importante, direta ou indiretamente, na gênese da HRF (SILVA et al., 2021). Especula-se que terapias que previnam a disfunção do SNA possam reduzir o grau de fragmentação. Dessa forma, a HRF pode constituir um novo biomarcador não invasivo de risco cardíaco, guiando, por exemplo, intervenções farmacológicas nessas doenças (SILVA et al., 2021). Por outro lado, o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase, como a PIR, vêm sendo estudados como forma de aumentar o tônus parassimpático e reverter a disfunção autonômica em DC (BARBOZA et al., 2019). Trabalhos anteriores mostraram que o tratamento crônico com PIR aumentou o tônus vagal cardíaco e preveniu a disfunção autonômica em animais com DC (LATARO et al., 2015; BARBOZA et al., 2019). Entretanto, ainda não se sabe quais os efeitos do tratamento crônico com PIR sobre a HRF de animais com DC. Dessa forma, este estudo propõe a hipótese de que o aumento do tônus autonômico vagal induzido pela PIR pode diminuir a HRF em animais com

disfunção cardiovascular, refletindo a melhora da condição cardiovascular com a PIR. Além disso, hipotetizamos que há uma correlação negativa entre os parâmetros de HRF e o ganho barorreflexo e BEI, uma vez que a diminuição destes índices são tidos como preditores de risco de mortalidade em DC.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o grau de HFR e os efeitos do aumento da atividade parassimpática, induzido pelo tratamento crônico com PIR, sobre a HRF em SHR e ratos com IC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a HRF em SHR e ratos com IC.
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com PIR sobre a HRF em SHR e ratos com IC.
- Avaliar se HRF correlaciona-se com medidas do tono autonômico cardíaco parassimpático e SBR.

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

As séries de intervalos cardíaco analisadas neste estudo foram obtidas a partir de registros de PA de dois estudos publicados anteriormente por Larato e colaboradores (2013; 2015), envolvendo a administração crônica de PIR em animais com IC e SHR. Para o estudo da IC foram utilizados ratos Wistar (250 – 300 g, 7 - 8 semanas de idade). Os experimentos para o estudo da HA foram conduzidos em ratos WKY e SHR com 5 semanas de idade. Nestes estudos os ratos foram mantidos em caixas plásticas padrão coletivas (50X30X10 cm), com livre acesso à ração e água, e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro/escuro de doze horas. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Protocolo nº.1477/2007 e 126/2011). Foram incluídos no estudo 6 grupos de animais, 3 grupos para o estudo da HA (WKY, SHR e SHR+ PIR) e 3 grupos para o estudo da IC (SHAM, IC e IC+PIR). Os protocolos experimentais utilizados para estudo da HA e IC são descritos a seguir.

3.1 ADMINISTRAÇÃO DA PIRIDOSTIGMINA, REGISTRO DA PA E ANÁLISE DO TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO EM WKY E SHR

A administração da PIR foi iniciada antes do início da hipertensão, quando os SHR tinham 5 semanas de vida. Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução: 5%; manutenção 1,5–3%) e implantados com minibombas osmóticas subcutâneas (Alzet, Modelo 2004) entre as escápulas para administrar a PIR (Valeant Farmaceutical do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) a 1,5 mg/kg/dia, concentração necessária para inibir a atividade da acetilcolinesterase plasmática em ~50%. O tratamento foi realizado por 16 semanas, e as minibombas osmóticas foram trocadas 4 vezes durante esse período. Não foi observado nenhum resultado adverso durante o tratamento com PIR nos animais. Ratos WKY e SHR de controle de mesma idade foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam minibombas fictícias. Ao final do período de tratamento, os ratos foram anestesiados com isoflurano (indução: 5%; manutenção 1,5–3%) e foram implantados cateteres de polietileno na artéria e veia femoral para registro da PA e administração de drogas, respectivamente. Após esse procedimento, os animais puderam se recuperar em gaiolas individuais por 24 horas. No dia do experimento, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT844; ADInstruments, Sydney, Austrália). A PA foi registrada continuamente (2 kHz) usando um IBM/PC conectado a um sistema PowerLab (ML866/P; ADInstruments), com os ratos livres dentro da gaiola. A PA basal foi registrada por 1h seguida por 15 minutos de registros após uma injeção em bolus de metilatropina (1mg/kg, iv; Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EUA). Ao final do protocolo os ratos foram eutanasiados por overdose de pentobarbital sódico (Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brasil). Para a determinar o tono parassimpático foram analisados 1 minuto de registro da FC basal e 30 segundos de registro durante a ação da atropina. Foi considerado tono parassimpático: FC após a atropina menos a FC basal. Os dados de tono parassimpático utilizados neste estudo para as análises de correlação foram os previamente publicados por Lataro e colaboradores (2015). Para mais informações sobre os dados de PA basal e tônus autonômico cardíaco, consultar Lataro e colaboradores (2015).

3.2 INDUÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Como descrito em Lataro e colaboradores (2013), a IC foi induzida pelo IM. Para isso, ratos Wistar (250–300 g, 7–8 semanas de idade) foram anestesiados com cetamina (50 mg / kg ip; União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (10 mg / kg ip; Hertape Calier Saúde animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e para dor os animais também receberam analgésicos e antibióticos. Inicialmente foi feita uma tricotomia na região do hemitórax esquerdo foi realizada. A assepsia do local foi feita com gaze estéril embebida em álcool 70%. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e submetidos a intubação orotraqueal para ventilação mecânica. Posteriormente, uma toracotomia esquerda foi feita para expor o coração. O pericárdio foi aberto e o coração exposto. O ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado e ligada (obstruída) entre a via de saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo com sutura de poliéster (4-0; Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, o coração foi repostado na cavidade torácica e a o tórax foi fechado. Ratos SHAM foram submetidos a um procedimento cirúrgico semelhante aos descritos acima, com exceção da ligadura da artéria coronária. O tamanho do IM foi confirmado por exame *post-mortem*; apenas animais com infarto > 40% da parede do ventrículo esquerdo foram considerados no estudo.

3.3 ADMINISTRAÇÃO DE PIRIDOSTIGMINA, REGISTRO DA PA E ANÁLISE DO TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO EM RATOS SHAM E COM IC

Após a cirurgia para ligadura da artéria coronária, os animais foram randomizados em grupos que receberam administração de PIR e grupos que não receberam. A PIR (Valeant Farmacêutica do Brasil, Campinas, SP, Brasil) foi preparada diariamente e administrada na água de beber (0,14 mg / ml) logo após o IM. As doses de PIR (0,14 mg / ml) foram administradas na água de beber durante 7 dias produzindo uma inibição média de 40% na atividade da acetilcolinesterase plasmática em comparação com os valores de pré-tratamento. O peso corporal e o consumo de água foram medidos todos os dias durante o protocolo de estudo de 4 semanas. Quatro semanas após IM ou ligadura fictícia os ratos foram anestesiados (tribromoetanol, 250 mg / kg ip; Sigma-Aldrich) e foram implantados cateteres de polietileno (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ) na artéria e veia femoral para registro da PA e

administração de drogas, respectivamente. As extremidades dos cateteres vasculares foram exteriorizadas e fixadas na nuca do animal. Após 48h, com os animais completamente recuperados da anestesia, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (Statham, P23 XL, Valley View, OH). A PA foi registrada continuamente (2 kHz) usando um IBM/PC equipado com uma interface analógica digital (220, Dataq, Akron, OH). Todas as gravações foram realizadas em ratos movendo-se livremente na gaiola durante aproximadamente 1 hora. Em seguida prosseguiu-se para a mensuração do tônus parassimpático por meio da administração de metilatropina (1mg/kg, iv; Sigma-Aldrich, ST Louis, MO, EUA). A PA dos animais foi registrada durante 15 minutos sob efeito da metilatropina. Ao final do protocolo experimental a eutanásia foi induzida por overdose de pentobarbital sódico (Rhobifarma Indústria Farmacêutica, Hortolândia, SP, Brasil). Os dados de tono parassimpático utilizados neste estudo para as análises de correlação foram os previamente publicados por Lataro e colaboradores (2013). Para mais informações sobre os dados de PA basal, tônus autonômico cardíaco e função cardíaca consultar Lataro e colaboradores (2013).

3.4 ANÁLISE FRAGMENTAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os registros de PA foram analisados *off-line* pelo módulo Blood Pressure do LabChart, (Versão 7 Pro. ADInstruments, Sydney, Austrália) um software de computador. Todos os registros de PA foram inspecionados visualmente e os erros de detecção foram corrigidos manualmente. Em seguida, os dados foram exportados para arquivos de texto. Posteriormente, os arquivos foram abertos no programa *PyBios* (SILVA; FAZAN; MARIN-NETO, 2020), um software de computador destinado à análise de sinais cardiovasculares. Em seguida, artefatos e batimentos ectópicos foram removidos das séries de intervalos cardíacos pelo seguinte procedimento: 1) Inicialmente foi selecionado um trecho com 5000 pontos (intervalos cardíacos) do registro original; 2) Uma janela de média móvel de 10 pontos foi usada para calcular a *linha de base* das séries de intervalos cardíacos; 3) Limiares de tolerância superior e inferior foram definidos a partir do deslocamento da *linha de base* para cima e para baixo, respectivamente, em uma porcentagem de 10% da média da linha de base; 4) Valores acima do limite superior ou abaixo do limite inferior foram removidos das séries; 5) As remoções nunca

excederam 5% do tamanho da série temporal. Posteriormente, utilizando o mesmo software, os seguintes índices de HRF foram calculados: a porcentagem geral de pontos de inflexão (PIP), a porcentagem de padrões sem pontos de inflexão (W_0), a porcentagem de padrões com um ponto de inflexão (W_1), a porcentagem de padrões com dois pontos de inflexão (W_2), a porcentagem de padrões com três pontos de inflexão (W_3), a porcentagem de padrões com pontos de inflexão misto, ou seja, tanto inflexões rígidos como suaves (W^M), a porcentagem de padrões com pontos de inflexão apenas suaves (W^S) e a porcentagem de padrões com ponto de inflexão apenas rígidos (W^H).

3.5 MÉTODO DA SEQUÊNCIA

Para esta análise foi utilizado o software de computador *CardioSeries*, um software destinado à análise de sinais cardiovasculares (disponível em: www.danielpenteado.com). Inicialmente foi selecionado um trecho com 5000 pontos (intervalos cardíacos) do registro original; em seguida foram definidos os seguintes parâmetros: o comprimento mínimo das sequências barorreflexas foi definido como $n = 4$. O limiar para alterações na PAS foi fixado em 0 mmHg e o limiar para mudanças em intervalo RR foi fixado em 0 ms. O atraso entre a PAS e o intervalo cardíaco foi definido como $delay = 0$. Uma sequência barorreflexa foi considerada apenas quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e intervalo cardíaco foi maior ou igual a 0,8. Os valores de ganho (BRS) e BEI totais foram reportados, ou seja, não foi feita distinção entre sequências do tipo *Up* e *Down*. Todas as sequências barorreflexas geradas pelo software foram inspecionadas visualmente e as sequências geradas a partir de trechos contendo artefatos ou batimentos ectópicos foram manualmente removidas.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças nos índices de HRF basais entre os grupos foram analisados pelo ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre o tono parassimpático e SBR, e os índices da HRF. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ÍNDICES DE HRF NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A Figura 5 mostra a os valores de PIP de ratos WKY, SHR e SHR+PIR. Não houve diferença entre os grupos experimentais.

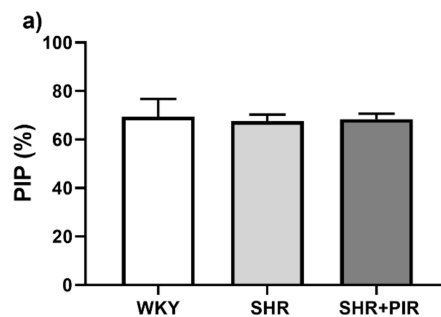


Figura 4. Porcentagem de pontos de inflexão (PIP) em ratos Wistar-Kyoto (WKY), ratos com hipertensão espontânea (SHR) e SHR tratados com piridostigmina (SHR+PIR). WKY: $n = 9$, SHR: $n = 6$, SHR + PIR: $n = 5$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

A Figura 6 mostra os valores de W_0 , W_1 , W_2 e W_3 de ratos WKY, SHR e SHR+PIR. Pode-se observar um aumento na porcentagem de padrões W_0 nos grupos SHR ($P=0,024$) e SHR+PIR ($P=0,012$) em comparação ao grupo WKY. No entanto, W_1 , W_2 e W_3 não apresentaram diferenças entre os grupos estudados.

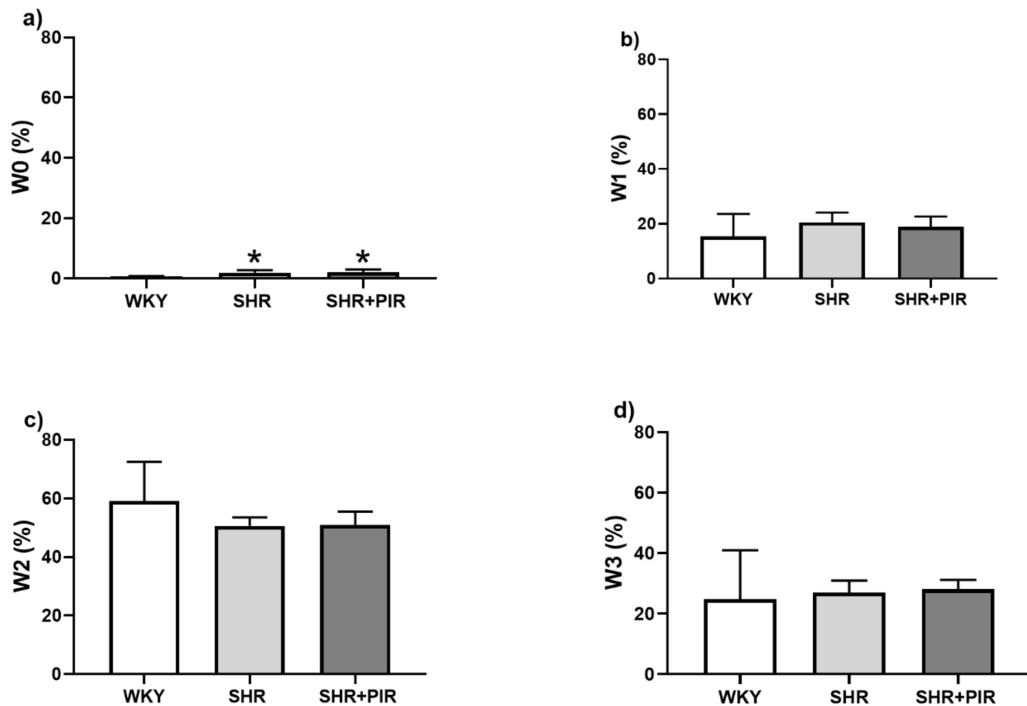


Figura 6. Índices simbólicos de fragmentação da frequência cardíaca (HRF) em ratos Wistar-Kyoto (WKY), ratos com hipertensão espontânea (SHR) e SHR tratados com piridostigmina (SHR+PIR). O gráfico (a) representa a porcentagem de padrões sem pontos de inflexão (W_0); gráfico (b) representa a porcentagem de padrões com um ponto de inflexão (W_1); o gráfico (c) representa a porcentagem de padrões com dois pontos de inflexão (W_2); o gráfico (d) representa a porcentagem de padrões com três pontos de inflexão (W_3). WKY: $n = 9$, SHR: $n = 6$, SHR + PIR: $n = 5$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. * indica $P < 0,05$ em comparação com o grupo WKY. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

A Figura 7 mostra a porcentagem de padrões do tipo W^M , W^S e W^H de ratos WKY, SHR e SHR+PIR. Observou-se uma redução na porcentagem de padrões W^H nos grupos SHR ($P=0,027$) e SHR+PIR ($P=0,018$) em comparação ao grupo WKY. No entanto, W^S e W^M não foram diferentes entre os grupos experimentais.

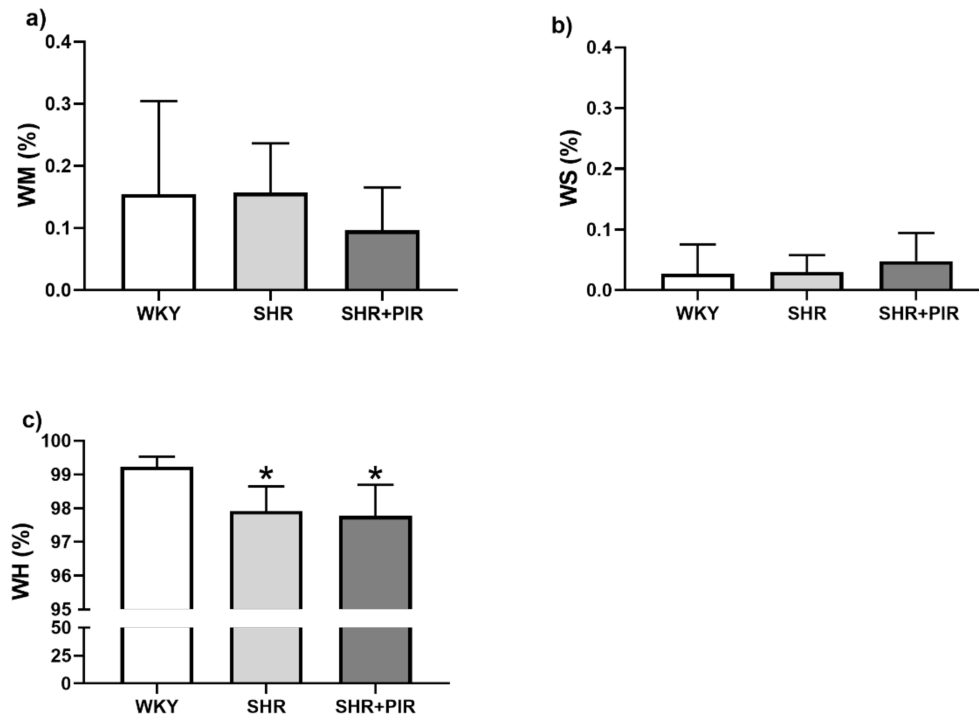


Figura 7. Índices simbólicos de fragmentação da frequência cardíaca (HRF) em ratos Wistar-Kyoto (WKY), ratos com hipertensão espontânea (SHR) e SHR tratados com piridostigmina (SHR+PIR). O gráfico (a) representa a porcentagem de padrões com pontos de inflexão misto (W^M); o gráfico (b) representa a porcentagem de padrões com pontos de inflexão suave (W^S); o gráfico (c) representa a porcentagem de padrões com ponto de inflexão rígido (W^H). WKY: $n = 9$, SHR: $n = 6$, SHR + PIR: $n = 5$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. * indica $P < 0,05$ em comparação com o grupo WKY. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

4.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES HRF, BARORREFLEXO E O TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A Figura 8 mostra a correlação entre os índices de HRF, barorreflexo e tono parassimpático de ratos WKY, SHR e SHR+PIR. O PIP não foi significativamente correlacionado com o tono parassimpático. Assim como os índices W_0 , W_1 , W_2 e W_3 , bem como W^H , W^S e W^M , também não foram significativamente correlacionados com o tono parassimpático. Da mesma forma, em relação aos índices da SBR, o ganho barorreflexo e BEI não foram significativamente correlacionados com PIP.

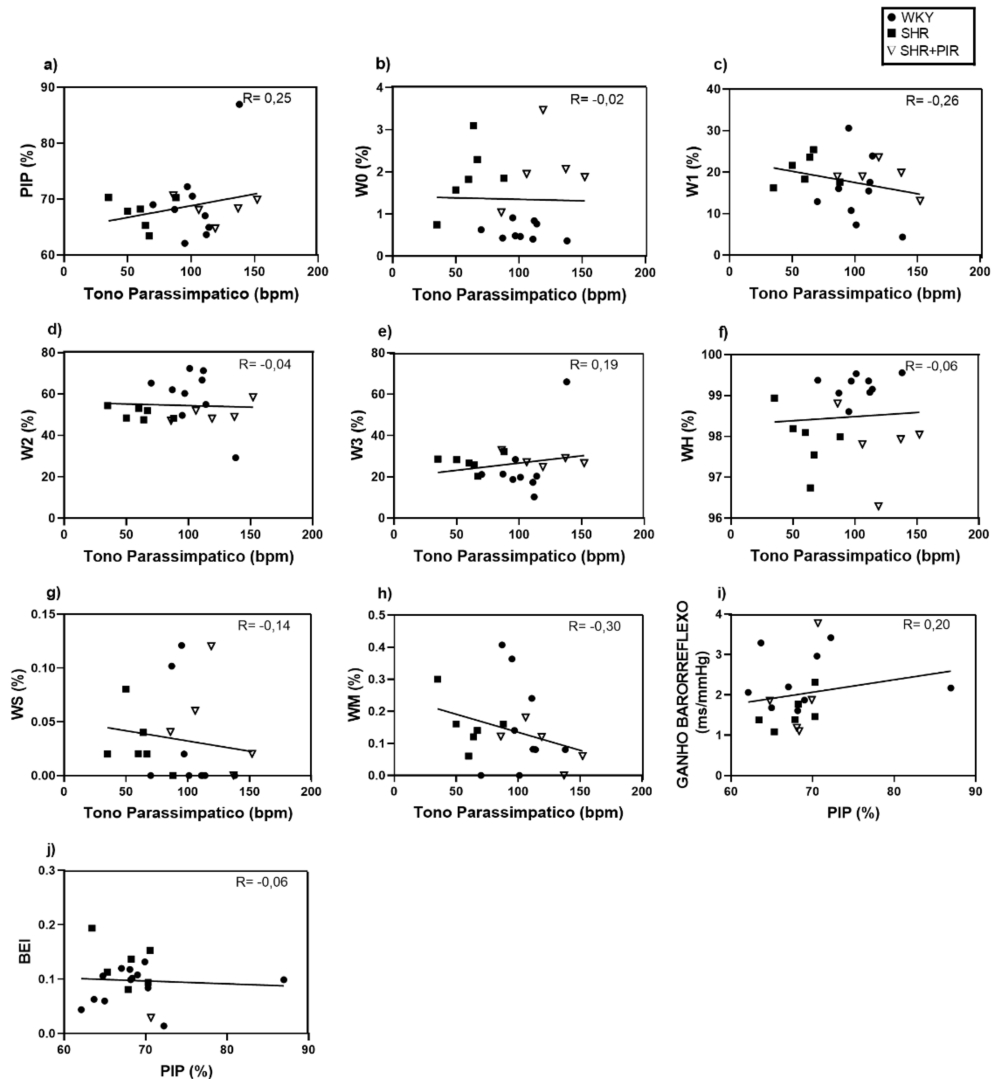


Figura 8. Correlação entre os índices de fragmentação da frequência cardíaca (HRF), tono parassimpático e índices do barorreflexo de ratos Wistar-Kyoto (WKY), ratos com hipertensão espontânea (SHR) e SHR tratados com piridostigmina (SHR+PIR). O gráfico (a) corresponde à correlação entre a porcentagem de pontos de inflexão (PIP) vs o tono parassimpático; o gráfico (b) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões sem ponto de inflexão (W_0); o gráfico (c) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com um ponto de inflexão (W_1); o gráfico (d) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com dois pontos de inflexão (W_2); o gráfico (e) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com três pontos de inflexão (W_3); o gráfico (f) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com ponto de inflexão rígido (W^H); o gráfico (g) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com pontos de inflexão suave (W^S); o gráfico (h) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com pontos de inflexão misto (W^M); o gráfico (i) corresponde à correlação entre PIP vs o ganho barorreflexo; o gráfico (j) corresponde à correlação entre PIP vs o índice de efetividade do barorreflexo (BEI). WKY: $n = 9$, SHR: $n = 6$. SHR, PIR: $n = 5$. O teste estatístico utilizado foi a correlação de Pearson. Fonte: o autor.

4.3 ÍNDICES DE HRF NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A Figura 9 mostra os valores de PIP de ratos SHAM, IC e IC+PIR. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

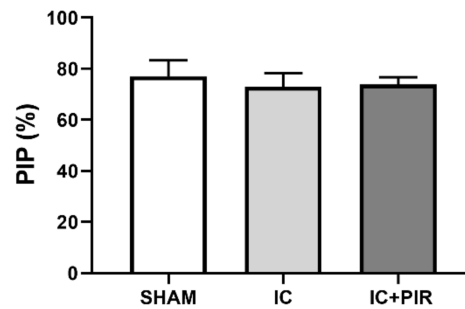


Figura 9. Porcentagem de pontos de inflexão (PIP) em ratos SHAM, ratos com insuficiência cardíaca (IC) e IC tratados com piridostigmina (IC+PIR). SHAM: $n = 5$, IC: $n = 6$, IC + PIR: $n = 7$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

A Figura 10 mostra os padrões do tipo W_0 , W_1 , W_2 e W_3 em ratos SHAM, IC e IC+PIR. Nenhum dos padrões avaliados foi diferente entre os grupos experimentais.

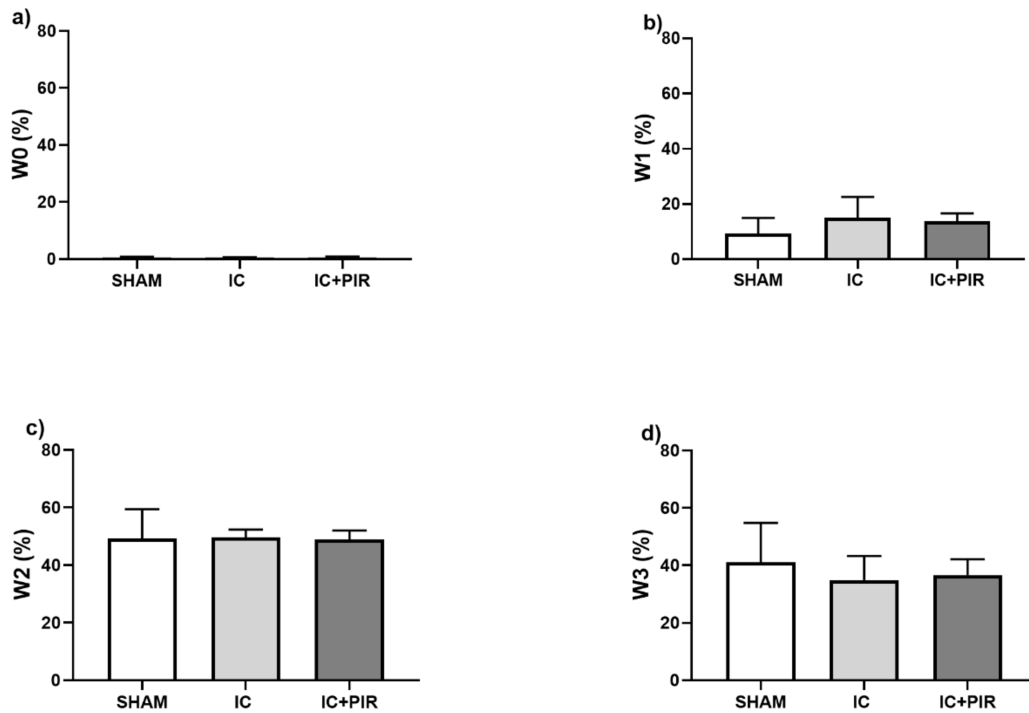


Figura 10. Índices simbólicos de fragmentação da frequência cardíaca (HRF) em ratos SHAM, ratos com insuficiência cardíaca (IC) e IC tratados com piridostigmina (IC+PIR). O gráfico (a) representa a porcentagem de padrões sem pontos de inflexão (W_0); o gráfico (b) representa a porcentagem de padrões com um ponto de inflexão (W_1); o gráfico (c) representa a porcentagem de padrões com dois pontos de inflexão (W_2); o gráfico (d) representa a porcentagem de padrões com três pontos de inflexão (W_3). SHAM: $n = 5$, IC: $n = 6$, IC+PIR: $n = 7$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

A Figura 11 mostra os padrões do tipo W^M , W^S e W^H em ratos SHAM, IC e IC+PIR. O grupo IC ($P=0,026$) e o grupo IC+PIR ($P=0,001$) apresentaram uma redução na porcentagem de palavras W^M em comparação ao grupo SHAM. Ademais, a porcentagem de padrões W^M foi menor no grupo IC+PIR ($P=0,023$) em comparação ao grupo IC. Já a porcentagem de padrões W^S foi menor no grupo IC+PIR ($P=0,032$) em comparação ao grupo SHAM. Por outro lado, a porcentagem de padrões W^H foi maior tanto no grupo IC ($P=0,023$), quanto no grupo IC+PIR ($P=0,001$) em relação ao grupo SHAM. Além disso, observou-se um aumento na porcentagem de padrões W^H no grupo IC+PIR ($P=0,024$) quando comparado ao grupo IC.

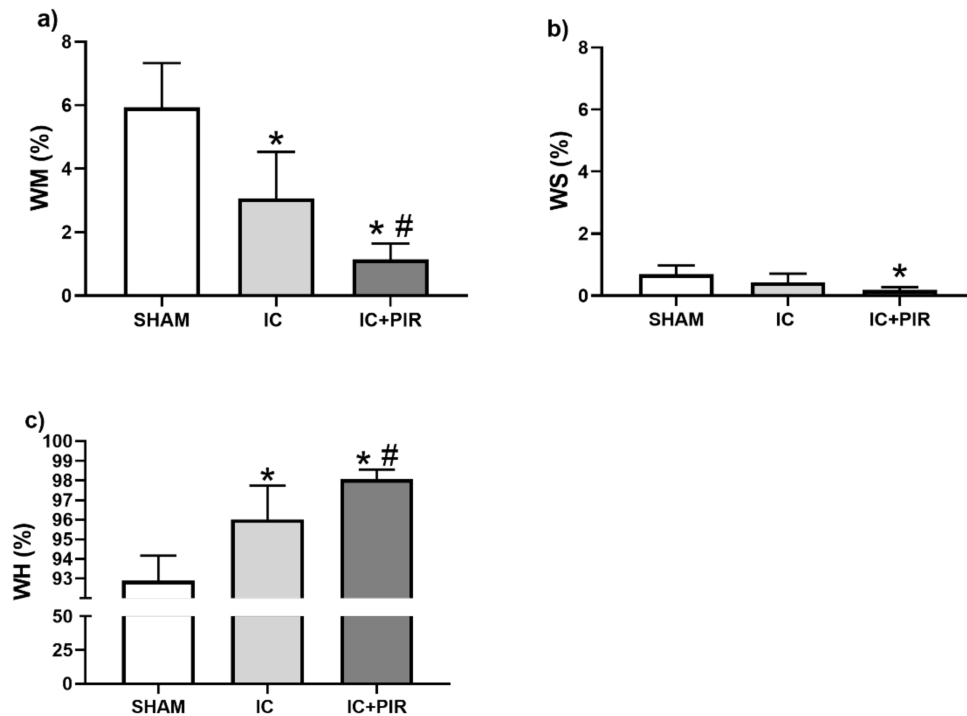


Figura 11. Índices simbólicos de fragmentação da frequência cardíaca (HRF) em ratos SHAM, ratos com insuficiência cardíaca (IC) e IC tratados com piridostigmina (IC+PIR). O gráfico (a) representa a porcentagem de padrões com pontos de inflexão misto (W^M); o gráfico (b) representa a porcentagem de padrões com pontos de inflexão suave (W^S); o gráfico (c) representa a porcentagem de padrões com ponto de inflexão rígido (W^H). SHAM: $n = 5$, IC: $n = 6$, IC + PIR: $n = 7$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. * indica $P < 0,05$ em comparação com o grupo SHAM, # indica $P < 0,05$ em comparação com o grupo IC. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. Fonte: o autor.

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES DE HRF, BARORREFLEXO E O TONO PARASSIMPÁTICO CARDÍACO NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A Figura 12 mostra a correlação entre os índices de HRF, barorreflexo e tono parassimpático de ratos SHAM, IC e IC+PIR. Tanto o PIP, como os índices W_0 , W_1 , W_2 e W_3 , bem como, W^H , W^S e W^M não foram significativamente correlacionados com o tono parassimpático. Em relação aos índices de barorreflexo espontâneo, o ganho barorreflexo e BEI também não foram significativamente correlacionados com PIP.

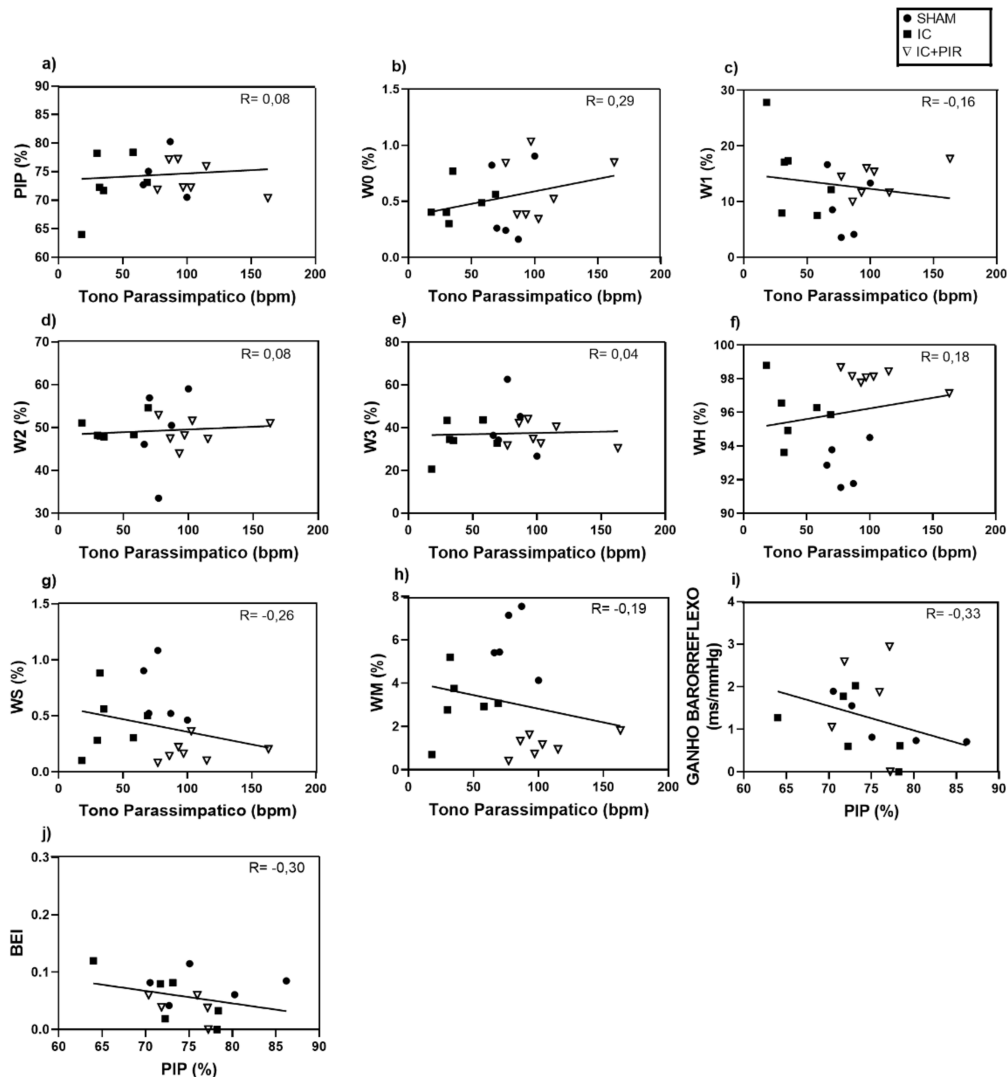


Figura 12. Correlação entre os índices de fragmentação da frequência cardíaca (HRF), tono parassimpático e índices do barorreflexo de ratos SHAM, ratos com insuficiência cardíaca (IC) e IC tratados com piridostigmina (IC+PIR). O gráfico (a) corresponde à correlação entre a porcentagem de pontos de inflexão (PIP) vs o tono parassimpático; o gráfico (b) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões sem ponto de inflexão (W_0); o gráfico (c) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com um ponto de inflexão (W_1); o gráfico (d) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com dois pontos de inflexão (W_2); o gráfico (e) corresponde a correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com três pontos de inflexão (W_3); o gráfico (f) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com ponto de inflexão rígido (W^H); o gráfico (g) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com pontos de inflexão suave (W^S); o gráfico (h) corresponde à correlação entre o tono parassimpático vs a porcentagem de padrões com pontos de inflexão misto (W^M); O gráfico (i) corresponde à correlação entre PIP vs o ganho barorreflexo; o gráfico (j) corresponde à correlação entre PIP vs o índice de efetividade do barorreflexo (BEI). SHAM: $n = 5$, IC: $n = 6$, IC + PIR: $n = 5$. O teste estatístico utilizado foi a correlação de Pearson. Fonte: o autor.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso trabalho mostram que: (i) nos grupos SHR e SHR+PIR a porcentagem de padrões W_0 aumentou, enquanto que a porcentagem de padrões W^H diminuiu em relação ao grupo WKY; (ii) nos grupos IC e IC+PIR a porcentagem de padrões W^H aumentou, ao passo que a porcentagem de padrões W^M diminuiu em comparação ao grupo SHAM. O grupo IC+PIR também apresentou um aumento na porcentagem de padrões W^H e uma diminuição da porcentagem de padrões W^M quando comparado ao grupo IC. Além disso, observou-se uma diminuição na porcentagem de padrões W^S no grupo IC+PIR em comparação ao grupo SHAM; (iii) o tono parassimpático cardíaco, os índices de HRF e da sensibilidade do barorreflexo não estão correlacionados nestes dois modelos experimentais.

Em indivíduos saudáveis, a VFC é atribuída principalmente às flutuações no tônus vagal, uma vez que o nó sinusal é mais ricamente inervado pelo sistema parassimpático do que simpático (HIRSCH; BISHOP, 1981). Além disso, como neurônios respiratórios fazem sinapses com o nervo vago, o acoplamento cardiorrespiratório que surge desta interação produz um padrão oscilatório nos intervalos cardíacos denominado de arritmia sinusal respiratória (HIRSCH; BISHOP, 1981). No entanto, sabe-se que há uma perda importante da modulação vagal em condições como o envelhecimento e na presença de DC. Nestes casos, as mudanças rápidas na FC não são mais majoritariamente mediadas pelo sistema parassimpático, caracterizando-se por transições frequentes entre aceleração e desaceleração da FC (STEIN et al., 2005). Essa observação levou ao desenvolvimento de uma nova abordagem para a análise da VFC de curto prazo, denominada HRF (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a).

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que o aumento da fragmentação tem associação clínica com morte em pacientes pós-IM no ensaio CAST (STEIN; LE; DOMITROVICH, 2008), com envelhecimento e doença coronariana no conjunto de dados THEW e, também, com morte cardiovascular no estudo MESA (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). Mais recentemente, o aumento da fragmentação foi associado à fibrilação atrial e à diminuição do desempenho cognitivo (COSTA et al., 2021a, b). Em contrapartida, este é o primeiro trabalho que analisa o papel de um anti-colinesterásico sobre a HRF. Inicialmente avaliamos o PIP, um índice de fragmentação que quantifica a porcentagem

geral de pontos de inflexão (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017a). O PIP não apresentou alteração entre os grupos estudados. Estes achados são diferentes dos resultados observados em trabalhos publicados anteriormente. Em humanos, Costa e colaboradores (2017a) relataram que o grau de fragmentação medido pelo PIP aumentou com a idade em indivíduos aparentemente saudáveis e em pacientes com doença arterial coronariana. Eles também relataram que o grau de HRF era maior nos pacientes cardíacos do que nos saudáveis. Os padrões W_0 e W_1 podem ser considerados os padrões menos fragmentados ou os mais fluentes, enquanto, os padrões W_2 e W_3 representam os mais fragmentados e os menos fluentes (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Os padrões W_1 e W_2 estão relacionados principalmente com o ritmo sinusal respiratório e representam de 60% a 70% das palavras produzidas (SILVA et al., 2021). Já os padrões W_0 , W_3 e PIP são os mais relevantes, pois são os parâmetros que de fato se correlacionam com a fragmentação (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Em nossa análise, W_0 aumentou nos SHR e não sofreu alterações nos animais com IC. Uma possível explicação para o aumento de W_0 no SHR pode estar relacionada, em parte, a uma diminuição das flutuações de alta frequência (diminuição da modulação vagal), o que se traduziria em um aumento de variações da FC no mesmo sentido (aceleração-aceleração ou desaceleração-desaceleração) (COSTA; DAVIS; GOLDBERGER, 2017b). Contudo, é importante destacar que um aumento desse índice também poderia ser observado em condições patológicas, como por exemplo na síndrome de apnéia do sono. Neste caso, o aumento de padrões W_0 estaria associado a alterações respiratórias, e conseqüentemente da arritmia sinusal respiratória, e não necessariamente a uma maior fluência na geração da FC (GUZIK et al., 2013). Recentemente, Costa e colaboradores também relataram que a porcentagem de padrões W_0 e W_1 (padrões mais fluentes) diminuiu e a porcentagem de padrões W_2 e W_3 (padrões mais fragmentados) aumenta com a idade e na presença de DC. No entanto, os SHR e ratos com IC do presente estudo não apresentaram diferença nos índices W_1 , W_2 e W_3 quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Esta inconsistência pode ser o resultado das diferentes espécies estudadas (humanos versus ratos). Além disso, outros fatores também devem ser levados em consideração, como o modelo experimental utilizado, a duração do protocolo e/ou o tipo de intervenção. Por exemplo, Omoto e colaboradores (2021) avaliaram a HRF de ratos submetido ao IM utilizando protocolos de 4 e 12 semanas após IM. Dentre os parâmetros avaliados, os pesquisadores observaram apenas aumento de W_3 nos ratos com 4 semanas após o IM; por

outro lado, os animais com 12 semanas após o IM apresentaram uma diminuição de W_0 , W_1 e um aumento de W_2 , enquanto W_3 não foi afetado. Assim, é bastante razoável considerar que os índices da HRF podem ser afetados por diferentes fatores. Mesmo assim, os dados do presente estudo sugerem que a PIR não altera os parâmetros de HRF nas duas condições fisiopatológicas estudadas.

Os padrões W^H , W^S e W^M referem-se aos tipos de pontos de inflexão e apresentam uma forte correlação com os índices do domínio do tempo (SDNN e RMSSD) e da frequência (potências absolutas em LF e HF) (SILVA et al., 2021). Silva e colaboradores (2021) relataram que o padrão W^H reduziu acentuadamente com o bloqueio farmacológico do sistema nervoso parassimpático. Em contraste, a porcentagem de padrões W^S e W^M aumentou sensivelmente com o bloqueio (SILVA et al., 2021). Acredita-se que os padrões W^H , W^S e W^M sejam mais afetados pelo sistema nervoso parassimpático do que pela modulação simpática devido à proximidade entre as bandas de frequência associadas às oscilações de alta frequência (modulação parassimpática) e ultra frequência (HRF) (SILVA et al., 2021). Em nossas análises, os padrões W^H , W^S e W^M foram os mais afetados nos dois modelos experimentais avaliados (SHR e ratos com IC). Nos animais com IC, a porcentagem de padrões W^H aumentou em ambos os grupos, i.e. tratados e não tratados com PIR, comparados aos animais SHAM. Observou-se, também, um aumento de padrões W^H nos animais IC+PIR comparado ao grupo IC. Além disso, os animais com IC, tratados e não tratados com PIR, apresentaram uma diminuição na porcentagem de padrões W^M comparados aos animais SHAM. No entanto, apenas os animais IC+PIR apresentaram uma diminuição dos padrões W^S em comparação aos animais SHAM. Esses achados são consistentes com os relatos de Costa e colaboradores (2017a) de que o aumento de padrões de tipo *hard*, juntamente com a diminuição de padrões de tipo *soft* e *mix*, apontam para uma maior HRF nos ratos com IC. Desta forma, os dados do presente estudo indicam que o grau de fragmentação foi maior nos animais com IC tratados com PIR, pois, neste grupo, houve um aumento da porcentagem de padrões W^H e redução de W^S e W^M . Entretanto, os índices W^H , W^S e W^M não apresentaram uma correlação significativa com o tônus parassimpático induzido pela PIR, sugerindo que outros fatores devem estar envolvidos diretamente na gênese da HRF.

A PIR tem sido usada em estudos experimentais para aumentar a atividade parassimpática. É possível que o aumento da disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica, decorrente da inibição da acetilcolinesterase, reverta a disfunção autonômica em SHR e ratos com IC (LATARO et al., 2013, 2015). Entretanto, os nossos dados sugerem que o aumento do tônus parassimpático induzido pela PIR não teve efeito sobre a HRF de SHR, sugerindo que outros fatores possam estar envolvidos diretamente na gênese da HRF. Por um lado, o tônus vagal não é o principal fator causador das oscilações da FC, e sim, a modulação da atividade vagal. Além disso, acreditamos que o perfil de geração e condução do estímulo elétrico dos cardiomiócitos tenham um papel importante na gênese da HRF. Omoto e colaboradores (2021) relataram que ratos submetidos ao IM (4 e 12 semanas após o infarto) apresentaram um aumento da HRF, mostrando que parâmetros funcionais cardíacos (fração de ejeção e fração de encurtamento) estão correlacionados, revelando uma relação direta entre a função cardíaca prejudicada e o aumento da HRF.

Até agora, várias hipóteses foram levantadas sobre a origem da HRF, dentre elas estão: a falhas na geração e condução do impulso elétrico cardíaco, a disfunção dos barorreceptores e/ou hiperatividade simpática (HAYANO et al., 2020; MAKOWIEC; WADOWCZYK, 2019). Para testar algumas dessas hipóteses, correlacionamos o tono parassimpático cardíaco com os índices de HRF e de função do barorreflexo; porém, ambos não mostraram associação nessas duas doenças. Por outro lado, Silva e colaboradores (2021) mostraram que o sistema nervoso parassimpático desempenha um papel fundamental na gênese da HRF, pelo menos em nível experimental. Os pesquisadores relataram que após o bloqueio seletivo de receptores colinérgicos em ratos saudáveis pode-se observar uma diminuição da HRF, sugerindo uma relação entre o aumento da HRF e atividade parassimpática. Entretanto, é importante ressaltar que animais saudáveis apresentam níveis fisiológicos de controle autonômico diferentes daqueles observados em modelos experimentais de IC ou HA (ativação crônica do simpático e atenuação da atividade parassimpática) (SILVA et al., 2021). Desse modo, ao que parece, cada condição fisiológica ou patológica apresenta um fator causal diferente para gênese da HRF.

Contudo, é importante ressaltar que o nosso estudo apresenta algumas limitações, como o baixo número de animais utilizados na amostra, o que poderia impactar diretamente nos resultados. Além disso, como a HRF considera as variações de FC (ou intervalo RR) de um batimento para outro para identificar acelerações e desacelerações da FC, a frequência de

amostragem do sinal utilizado para estimar o intervalo RR (ECG ou PA) tem um grande impacto nos resultados. Por exemplo, a probabilidade de encontrar padrões do tipo W_0 é inversamente proporcional à frequência de amostragem. Neste estudo, a frequência de amostragem utilizada na aquisição dos sinais de PA foi 2 kHz. A comparação destes resultados com a HRF obtida de sinais com diferentes frequências de amostragem devem ser feitas com cautela.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem afirmar em relação aos parâmetros da HRF que: (i) nos SHR, apenas a porcentagem de padrões W_0 aumentou, enquanto W^H diminuiu, e o tratamento com PIR não apresentou efeito sobre a HRF nos SHR; (ii) nos ratos com IC, a porcentagem de padrões W^H aumentou e W^M diminuiu nos animais tratados e não tratados com PIR. Por outro lado, W^S diminuiu apenas nos animais tratados com PIR (i.e. IC + PIR); (iii) nos animais IC + PIR houve um aumento da porcentagem de padrões W^H e redução de W^M em comparação aos animais IC, o que pode sugerir um maior grau de HRF; (iv) o tono parassimpático, o ganho barorreflexo e o BEI não estão correlacionados com os índices de HRF nessas duas doenças. Assim, os dados do presente estudo sugerem que o aumento do tono parassimpático induzido pelo tratamento com PIR não promoveu alterações na HRF nos SHR. Por outro lado, na IC, os dados sugerem um possível aumento no grau de HRF nos animais IC tratados com PIR. Entretanto, como não houve correlação entre o tônus parassimpático e os índices de HRF, acreditamos que existem outros fatores (não autonômicos) envolvidos na gênese da HRF. Portanto, conclui-se que o tratamento com PIR não foi eficiente em diminuir a HRF nos SHR e nos ratos com IC. Por fim, é importante ressaltar que a excitabilidade e a condutibilidade das células miocárdicas são afetadas por diversos fatores, incluindo a modulação autonômica para o coração e fatores humorais e estruturais, tornando difícil a interpretação dos mecanismos responsáveis pela gênese da HRF. Destacamos a necessidade de estudos futuros para maior entendimento sobre a participação dos fatores humorais na gênese da HRF.

7 REFERÊNCIAS

- BARBOZA, C. A. *et al.* Cholinergic Stimulation by Pyridostigmine Bromide Before Myocardial Infarction Prevent Cardiac and Autonomic Dysfunction. **Scientific Reports**, [S. L.], v. 9, n. 1, p. 1-11, Feb. 2019.
- BENARROCH, E. E. Physiology and Pathophysiology of the Autonomic Nervous System. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, [S. L.], v. 26, n. 1, p. 12-24, Feb. 2020.
- BOROVAC, J. A. *et al.* Sympathetic nervous system activation and heart failure: Current state of evidence and the pathophysiology in the light of novel biomarkers. **World Journal of Cardiology**, [S. L.], v 12, n. 8, p. 373-408. Aug. 2020.
- CAETANO, J.; DELGADO ALVES, J. Heart rate and cardiovascular protection. **European Journal of Internal Medicine**, [S. L.], v 26, n 4, p. 217-222, May. 2015.
- CAULEY, E. *et al.* Neurotransmission to parasympathetic cardiac vagal neurons in the brain stem is altered with left ventricular hypertrophy-induced heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. L.], v. 309, n. 8, p. 281-287, Oct. 2015.
- CHAPLEAU, M. W. *et al.* Chronic vagal nerve stimulation prevents high-salt diet-induced endothelial dysfunction and aortic stiffening in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. L.], v. 311, n. 1, p. 276-285, Jul. 2016.
- CONCEIÇÃO, G. *et al.* Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. **Netherlands Heart Journal**, [S. L.], v. 24, n. 4, p. 275-286, Apr. 2016.
- COSTA, M. D. *et al.* Heart rate fragmentation as a novel biomarker of adverse cardiovascular events: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Frontiers in Physiology**, [S. L.], v. 9, n. 3, p. 1117, Sep, 2018.
- COSTA, M. D. *et al.* Fragmented sinoatrial dynamics in the prediction of atrial fibrillation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. L.], v. 320, n. 1, p. 256-271, Jan. 2021a.
- COSTA, M. D. *et al.* Prediction of Cognitive Decline Using Heart Rate Fragmentation Analysis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Frontiers in Aging Neurosci**, [S. L.], v. 13, p. 708130, Aug. 2021b.
- COSTA, M. D.; DAVIS, R. B.; GOLDBERGER, A. L. Heart rate fragmentation: A symbolic dynamical approach. **Frontiers in Physiology**, [S. L.], v. 8, p. 827, Nov, 2017b.
- COSTA, M. D.; DAVIS, R. B.; GOLDBERGER, A. L. Heart rate fragmentation: A new approach to the analysis of cardiac interbeat interval dynamics. **Frontiers in Physiology**, [S.

L.J., v. 8, p. 255, May, 2017a.

DAMPNEY, R. A. *et al.* Regulation of sympathetic vasomotor activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. L.J.*], v. 315, n. 5, p. 1200-1214, Nov. 2018.

DE CASTRO, Q. J. T. *et al.* Physical Exercise Combined with Antihypertensive Drug Therapy on Left Ventricular Hypertrophy: Systematic Review and Meta-Analysis. **Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, [*S. L.J.*], v. 27, n. 6, p. 493-503, Dec. 2020.

DE VILLIERS, C.; RILEY, P. R. Mouse models of myocardial infarction: Comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. **DMM Disease Models and Mechanisms**, [*S. L.J.*], v. 13, n. 11, p. 46565, Nov. 2020.

DELLIAUX, S. *et al.* Mental Workload Alters Heart Rate Variability, Lowering Non-linear Dynamics. **Frontiers in Physiology**, [*S. L.J.*], v. 10, p. 565. May, 2019.

DESAI, M. Y. *et al.* Pharmacologic modulation of parasympathetic activity in heart failure. **Heart Failure Reviews**, [*S. L.J.*], v. 16, n. 2, p. 179-193, Mar. 2011.

DICKHOUT, J. G.; LEE, R. M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. L.J.*], v. 274, n. 3, p. 794-800, Mar. 1998.

DI RIENZO, M. *et al.* Baroreflex effectiveness index: An additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [*S. L.J.*], v. 280, n. 3, p. 744-751. Mar. 2001.

DORIS, P. A. Genetics of hypertension: An assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. **Physiological Genomics**, [*S. L.J.*], v. 49, n. 11, p. 601-617, Nov. 2017.

FOURADOULAS, M.; VON KÄNEL, R.; SCHMID, J.-P. Herzfrequenzvariabilität – Stand der Forschung und klinische Anwendbarkeit. **Praxis**, [*S. L.J.*], v. 108, n. 7, p. 461-468, May. 2019.

GOLDBERGER, A. L.; PENG, C. K.; LIPSITZ, L. A. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? **Neurobiology of Aging**, [*S. L.J.*], v. 23, n. 1, 23-26. Jan. 2002.

GRASSI, G.; MARK, A.; ESLER, M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. **Circulation Research**, [*S. L.J.*], v. 116, n. 6, p. 976-990, Mar. 2015.

GROENEWEGEN, A. *et al.* Epidemiology of heart failure. **European Journal of Heart Failure**, [*S. L.J.*], v. 22, n. 8, p. 1342-1356, Aug. 2020.

GU, F. *et al.* Potential role of intermittent functioning of baroreflexes in the etiology of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **JCI Insight**, [S. L.], v. 5, n. 19, p. 139789, Oct. 2020.

GUZIK, P. *et al.* Obstructive sleep apnea and heart rate asymmetry microstructure during sleep. **Clinical Autonomic Research**, [S. L.], v. 23, n. 2, p. 91-100, Apr. 2013.

HAYANO, J. *et al.* Impact of Heart Rate Fragmentation on the Assessment of Heart Rate Variability. **Applied Sciences**, [S. L.], v.10, n. 9, p. 3314, Jan. 2020.

HE, X. *et al.* Novel strategies and underlying protective mechanisms of modulation of vagal activity in cardiovascular diseases. **British Journal of Pharmacology**, [S. L.], v. 172, n. 23, p. 5489-5500, Dec. 2015.

HIRSCH, J. A.; BISHOP, B. Respiratory sinus arrhythmia in humans: How breathing pattern modulates heart rate. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [S. L.], v. 10, n. 4, p. 620-629, Oct. 1981.

TASK FORCE. European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. **European Heart Journal**, [S. L.], v. 93, n. 5, p. 1143-1165, Mar. 1996.

KAINUMA, S. *et al.* Influence of coronary architecture on the variability in myocardial infarction induced by coronary ligation in rats. **PLoS ONE**, [S. L.], v. 12, n. 8, p. e0183323, Aug. 2017.

LATARO, R. M. *et al.* Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. L.], v. 305, n. 8, p. 908-916, Oct. 2013.

LATARO, R. M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibition attenuates the development of hypertension and inflammation in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, [S. L.], v. 28, n. 10, p. 1201-1208, Oct. 2015.

LAUDE, D. *et al.* Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. L.], v. 286, n. 1, p. 226-231, Sep, 2004.

LEFEBVRE, F. *et al.* Modification of the pulmonary renin-angiotensin system and lung structural remodelling in congestive heart failure. **Clinical Science**, [S. L.], v. 111, n. 3, p. 217-224, Sep. 2006.

LI, D. *et al.* Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. **Hypertension**, [S. L.], v. 59, n. 3, p. 642-649, Mar, 2012.

LI, M. *et al.* Vagal Nerve Stimulation Markedly Improves Long-Term Survival after Chronic Heart Failure in Rats. **Circulation**, [S. L.], v. 109, n. 1, p. 120-124, Jan. 2004.

LUCINI, D.; PAGANI, M. Heart rate variability, autonomic regulation and myocardial ischemia. **International Journal of Cardiology**, [S. L.], v. 312, p. 22-23, Aug. 2020.

LU, Y. *et al.* Long-term administration of pyridostigmine attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signalling. **J Cell Mol Med**, [S. L.], v. 21, n. 9, p. 2106-2116, Sep. 2017.

MAKOWIEC, D.; WDOWCZYK, J. Patterns of Heart Rate Dynamics in Healthy Aging Population: Insights from Machine Learning Methods. **Entropy (Basel)**, [S. L.], v. 21, n. 12, p. 1206, Dec. 2019.

MANABE, N. *et al.* Presynaptic interaction between vagal and sympathetic innervation in the heart: modulation of acetylcholine and noradrenaline release. **Journal of the Autonomic Nervous System**, [S. L.], v. 32, n. 3, p. 233-242, Mar. 1991.

MANN, J. A.; ABRAHAM, W. T. Cardiac Contractility Modulation and Baroreflex Activation Therapy in Heart Failure Patients. **Current Heart Failure Reports**, [S. L.], v. 16, n. 1, p. 38-46, Feb. 2019.

OMOTO, A. *et al.* Heart rate fragmentation, a novel approach in heart rate variability analysis, is altered in rats 4 and 12 weeks after myocardial infarction. **Med Biol Eng Comput**, [S. L.], v. 59, n.11, p. 2373-2382, Oct. 2021.

OKAMOTO, K. *et al.* Further Observations of the Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. **JAPANESE CIRCULATION JOURNAL**, [S. L.], v. 30, n. 6, p. 703-716, Jun. 1966.

PFEFFER, MA.; SHAH, AM.; BORLAUG, BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. **Circ Res**. [S. L.], v.124, n.11, p.1598-1617, May.2019.

RYSZ, J. *et al.* Pharmacogenomics of hypertension treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. L.], v. 21, n. 13, p. 4709, Jul. 2020.

SAXENA, T.; ALI, A. O.; SAXENA, M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, [S. L.], v. 16, n. 12, p. 879-887, Dec. 2018.

SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health**, [S. L.], v. 5, p. 258, Sep. 2017.

SHANKS, J. *et al.* Ganglion-specific impairment of the norepinephrine transporter in the

hypertensive rat. **Hypertension**, [S. L.], v. 61, n. 1, p. 187- 193, Nov. 2013.

SILVA, T. M. DA *et al.* The role of the autonomic nervous system in the patterns of heart rate fragmentation. **Biomedical Signal Processing and Control**, [S. L.], v. 67, p. 102526, May. 2021.

SILVA, L. E. V.; FAZAN, R.; MARIN-NETO, J. A. PyBioS: A freeware computer software for analysis of cardiovascular signals. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, [S. L.], v. 197, p. 105718, Dec. 2020.

STEIN, P. K. *et al.* Sometimes higher heart rate variability is not better heart rate variability: Results of graphical and nonlinear analyses. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, [S. L.], v. 16, n. 9, p. 954-959, Sep. 2005.

STEIN, P. K.; LE, Q. C.; DOMITROVICH, P. P. Development of more erratic heart rate patterns is associated with mortality post-myocardial infarction. **Journal of Electrocardiology**, [S. L.], v. 41, n. 2, p.110-115, Mar. 2008.

TOSCHI-DIAS, E. *et al.* Contribution of autonomic reflexes to the hyperadrenergic state in heart failure. **Frontiers in Neuroscience**, [S. L.], v. 11, p. 162, Mar. 2017.

VIRANI, S. S. *et al.* Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. **Circulation**, [S. L.], v. 141, n. 9, p. 139-596, Jan. 2020.

WESSEL, N. *et al.* Instantaneous Cardiac Baroreflex Sensitivity: xBRS Method Quantifies Heart Rate Blood Pressure Variability Ratio at Rest and During Slow Breathing. **Frontiers in Neuroscience**, [S. L.], v. 14, p. 547433, Sep. 2020.

YUGAR-TOLEDO, J. C. *et al.* Posicionamento brasileiro sobre hipertensão arterial resistente – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. L.], v. 114, n. 3, p. 576-596, Mar, 2020.

ZHANG, X. *et al.* A novel hydrodynamic approach of drag-reducing polymers to improve left ventricular hypertrophy and aortic remodeling in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Nanomedicine**, [S. L.], v. 11, p. 6743–6751, Dec. 2016.

ZHOU, J. J. *et al.* Impaired Hypothalamic Regulation of Sympathetic Outflow in Primary Hypertension. **Neuroscience Bulletin**, [S. L.], v. 35, n. 1, 124-132. Dec. 2019.