

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

**EFEITOS CRÔNICOS DA IVABRADINA SOBRE O CONTROLE AUTONÔMICO
TÔNICO CARDIOVASCULAR E O REMODELAMENTO VENTRICULAR EM
RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PÓS-DESMAME**

Autora: Mariana Reis Guedes

Ouro Preto

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR

**EFEITOS CRÔNICOS DA IVABRADINA SOBRE O CONTROLE AUTONÔMICO
TÔNICO CARDIOVASCULAR E O REMODELAMENTO VENTRICULAR EM
RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PÓS-DESMAME**

Autora: Mariana Reis Guedes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca-Jr

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Coorientadora: Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva

Ouro Preto

2017

G934e

Guedes, Mariana Reis.

Efeitos crônicos da ivabradina sobre o controle autonômico tônico cardiovascular e o remodelamento ventricular em ratos submetidos à desnutrição proteica pós-desmame [manuscrito] / Mariana Reis Guedes. - 2017.

69f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca-Jr.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Desnutrição proteico-energética. 2. Insuficiência cardíaca. 3. Ivabradina .
I. Chianca-Jr, Deoclécio Alves . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.
Titulo.

CDU: 591.13

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Título:

“ Efeitos crônicos da ivabradina sobre o controle autonômico tônico cardiovascular e o remodelamento ventricular em ratos submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.”

Apresentado por: **Mariana Reis Guedes**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior (UFOP) - Orientador

Prof. Dr. Mauro César Isoldi (UFOP) - Examinador

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva (Universidade Fed. do Triângulo Mineiro) - Examinador

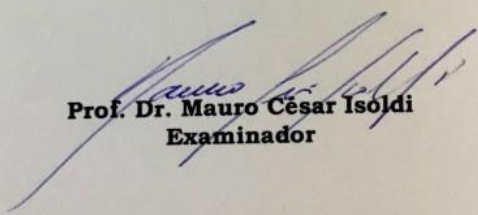
AVALIAÇÃO



APROVADA



REPROVADA


Prof. Dr. Mauro César Isoldi
Examinador

DATA DA DEFESA: **17/03/2017**

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559 1680
E-mail: nupeb@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br



APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** do **Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas** da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel e Heloiza, por sempre acreditarem em meu trabalho e me apoiarem em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por dar-me força, coragem, sabedoria e oportunidade para que pudesse realizar o meu trabalho.

Aos meus pais, Manoel e Heloiza, que sempre me proporcionaram tudo que estavam ao seu alcance, sempre me ensinando a lutar pelos meus sonhos. A vocês, que são os exemplos de honestidade, dedicação e fonte inesgotável de amor, minha eterna gratidão. À minha irmã Laura que é um exemplo de felicidade e generosidade.

Ao Guilherme pelo companheirismo, paciência e carinho.

Aos meus avós, padrinhos, tios e primos que não mediram esforços para me ajudar nessa jornada, me incentivando sempre.

Agradeço ao meu orientador Deoclécio Chianca e aos meus coorientadores Rodrigo Menezes e Fernanda Silva pela paciência, confiança, incentivo, e por todo o tempo dedicado a mim durante o desenvolvimento deste trabalho. Vocês são fonte de inspiração.

À minha amiga, Máira, pelas contribuições durante todo esse tempo de pesquisa, pelos ensinamentos, paciência, atenção e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular Thayane, Glenda, Sylvana, Franciny, Paulo, Laura, Luís, Aline Resende, Aline Maria, Marly e Sr. Miltinho por todo esse tempo de pesquisa, amizade, amparo e incentivo.

Aos professores da banca examinadora Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva e prof. Dr. Mauro César Isoldi pela disponibilidade de contribuir com suas grandiosas experiências para a conclusão deste trabalho.

Aos Laboratórios do NUPEB e seus professores responsáveis, principalmente ao Laboratório de Fisiopatologia Experimental, pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP pelo fornecimento dos animais. Em especial a Ângela pela compreensão e colaboração.

Aos antigos amigos e aos que se tornaram durante essa etapa que se encerra, obrigada por confiarem em mim e por me proporcionar momentos maravilhosos na companhia de vocês.

Enfim, muito obrigada a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A desnutrição é uma síndrome clínica de caráter social, de natureza multifatorial, caracterizada pela existência de um desequilíbrio nutricional que dificulta o funcionamento adequado do organismo. A desnutrição imposta em fases importantes do desenvolvimento apresenta efeitos severos e permanentes, proporcionando um comprometimento do controle cardiovascular, acometendo o sistema nervoso autônomo (SNA). Adicionalmente, o processo patológico da desnutrição pode estar associado a diversas alterações fisiológicas, ocasionando um prejuízo na performance miocárdica, acarretando em remodelamento ventricular e disfunção cardíaca. Estudos em ratos demonstraram elevação da corrente funny (If) em corações hipertrofiados ou com insuficiência cardíaca (IC). A If, corrente catiônica dos canais ativados por hiperpolarização e modulados por nucleotídeos cíclicos (HCNs), é essencial para a despolarização espontânea da membrana das células e em situações onde há remodelamento cardíaco, o aumento da densidade da If, pode ser um substrato para a arritmogênese e taquicardia na desnutrição proteica. Sabendo que a ivabradina, fármaco que bloqueia os canais HCNs, é capaz de reduzir a frequência cardíaca (FC) por meio da diminuição da If e contribuir para melhora do remodelamento cardíaco em corações hipertrofiados e com IC, torna-se relevante o estudo da ação deste fármaco sobre os parâmetros cardíacos na desnutrição proteica. Desse modo, objetivamos avaliar o efeito da ivabradina sobre o controle autonômico tônico da frequência cardíaca e remodelamento ventricular esquerdo de ratos submetidos a desnutrição proteica pós-desmame. Para tal, realizou-se o protocolo nutricional (dieta padrão e dieta hipoproteica) por um período de 35 dias, seguida do tratamento crônico com ivabradina (1mg/Kg/dia, i.p.) ou PBS (1mL/Kg, i.p.) por 8 dias consecutivos. Logo após, avaliamos o efeito da ivabradina sobre a FC de repouso e FC intrínseca (FCi), controle autonômico cardíaco e peso relativo do ventrículo esquerdo. Desse modo, nossos resultados apontam que a ivabradina diminuiu a FC de repouso e, interessante, reverteu as alterações do SNA, diminuindo a atividade simpática cardíaca e aumentando a atividade parassimpática cardíaca que estavam alteradas na desnutrição, bem como, melhorou o índice simpato-vagal e proporcionou a redução da FCi nesses animais. Observamos também que a ivabradina melhorou o peso relativo do ventrículo esquerdo, um marcador de remodelamento cardíaco. Portanto, nossos resultados sugerem que a ivabradina apresenta importante papel em situações patológicas (i.e. desnutrição) revertendo as alterações do controle autonômico do coração e melhorando o remodelamento cardíaco.

Palavra-chave: Desnutrição proteica; Controle autonômico cardíaco; Ivabradina.

ABSTRACT

Malnutrition is a social clinical syndrome, of a multifactorial nature, characterized by the existence of a nutritional imbalance, difficulting proper functioning of the body. Malnutrition, when imposed at important stages of development, cause severe and permanent damages, leading to an impairment of cardiovascular control, affecting the autonomic nervous system (ANS). In addition, the pathological process of malnutrition may be associated with several physiological adjustments, causing myocardial performance impairment, leading to ventricular remodeling and cardiac dysfunction. Studies in rats, showed that animals with hypertrophied hearts or heart failure, present an elevation of the funny current (If). The If, a cationic current derived from the hyperpolarization-activated cyclic nucleotides gated (HCNs) channels, is essential for cell membrane spontaneous depolarization. In cardiac remodeling, the elevation of the If, may be a substrate for arrhythmogenesis and tachycardia in protein malnutrition. Knowing that ivabradine, a drug that blocks the HCNs channels, is capable of reducing heart rate (HR) and to improve cardiac remodeling in hypertrophied hearts and in heart failure, studying the ivabradine action on cardiac adjustments caused by protein malnutrition, becomes relevant. Thus, we aim to evaluate the effect of ivabradine on the autonomic control of heart rate and left ventricular remodeling of rats submitted to post-weaning protein malnutrition. For that, we submitted rats to a nutritional protocol (standard diet and hypoprotein diet) for a period of 35 days, followed by ip. treatment with ivabradine (1mg / kg / day) or PBS (1mL / kg) for 8 consecutive days. Right after, we evaluated the effect of ivabradine on resting HR and intrinsic HR (iHR), cardiac autonomic control and relative weight of the left ventricle. Thereby, our results indicate that ivabradine decreases resting HR and, interestingly, reverted the changes in the ANS, decreasing cardiac sympathetic activity and increasing cardiac parasympathetic activity that were altered in malnutrition, as well as improving the sympatho-vagal index and providing a reduction of the iHR in these animals. We also observed that ivabradine improved the relative weight of the left ventricle, a marker of cardiac remodeling. In summary, our results suggest that ivabradine plays an important role in pathological conditions (i.e. malnutrition), reverting the cardiac autonomic control and improving cardiac remodeling.

Keywords: Protein malnutrition; Autonomic cardiac control; Ivabradine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 : Estrutura química da Ivabradina. Fonte: (Vaquero et al., 2007).....26
- Figura 2 - A e B: Protocolo de desnutrição proteica e injeção de ivabradina ou PBS. Após o nascimento, os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, foram divididos em dois grupos: grupo controle (dieta padrão com 15% de proteína) e grupo desnutrido (dieta hipoproteica com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período, os animais foram submetidos a injeção de ivabradina ou PBS por 8 dias consecutivos e utilizados para experimentação neste período. 33
- Figura 3 : Imagem de um conector soquete torneado de 3 pinos DIP e imagem representativa de um conector de 3 pinos conectado aos fios de cobre, Fio 1 – (V2), fio 2 – (terra), fio 3 - (V1). O posicionamento dos fios está descrito detalhadamente no item 4.7. 35
- Figura 4 : Desenho esquemático da canulação da veia jugular externa e implante de eletrodos para a aquisição do sinal eletrocardiográfico (Fortes, L.H.S., 2010). 36
- Figura 5 : Representação da janela de visualização do software LabChart durante o registro eletrocardiográfico e FC. Canais de registro: 5- ECG, 6- FC..... 37
- Figura 6 : Escala temporal do protocolo experimental para avaliação do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares em animais controle e desnutrido submetidos a injeção de ivabradina ou PBS (1mg/kg) durante o registro de ECG. Fármaco 1: Nitrato de metil-atropina (2mg/kg/mL). Fármaco 2: Metoprolol (2mg/kg/mL). Em metade dos animais os fármacos foram administrados na ordem representada (1 e 2). Na outra metade a ordem dos fármacos foi invertida. 38
- Figura 7 : Efeito da ivabradina sobre o peso corporal (g) dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao grupo controle PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls)..... 41
- Figura 8 : Efeito da ivabradina sobre a frequência cardíaca de repouso dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls)..... 42
- Figura 9 : Influência da ivabradina sobre o efeito vagal cardíaco dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two- way, pós-teste de Newman-Keuls)..... 43
- Figura 10 : Influência da ivabradina sobre o efeito simpático cardíaco dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls)..... 44

Figura 11 : Influência da ivabradina sobre a frequência cardíaca intrínseca dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls)..... 45

Figura 12 : Ação da ivabradina sobre o Índice Simpato-vagal dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupos Desnutrido PBS PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls). 46

Figura 13 : Efeito da ivabradina sobre o peso relativo do ventrículo esquerdo (mg/g) dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupos Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls). 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição Química das Dietas Controle e Hipoproteica (g/100g de dieta).....	32
Tabela 2: Confeção de Cânula veia Jugular.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
CCA	Centro de Ciência Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animais
ECG	Eletrocardiograma
EMEA	Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos
EPM	Erro padrão da média
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FC	Frequência cardíaca
FCi	Frequência cardíaca intrínseca
GC	Grupo Controle
GD	Grupo Desnutrido
HCN	Canais catiônicos ativados por hiperpolarização e modulados por nucleotídeos cíclicos
IC	Insuficiência cardíaca
ICaL	Corrente de influxo de cálcio do tipo-L
ICaT	Corrente de influxo de cálcio do tipo-T
If	Corrente funny
ISV	Índice Simpato-vagal
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravascular
IVA	Ivabradina
LFC	Laboratório de Fisiologia Cardiovascular
PAM	Pressão arterial média
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Polietileno
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PVPI	Iodopovidona
RAS	Sistema Renina Angiotensina
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Restrição proteica

SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VE	Ventrículo esquerdo
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1- Desnutrição.....	18
1.1-1. <i>Conceito de Desnutrição</i>	18
1.1-2. <i>Epidemiologia da Desnutrição</i>	18
1.2- Desnutrição, comprometimento autonômico e remodelamento cardíaco.....	19
1.3- Canal HCN e Excitação Cardíaca	22
1.4- Ivabradina – Bloqueador seletivo da If.....	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1- Geral.....	30
3.2- Específicos.....	30
4. METODOLOGIA	31
4.1- Modelo Animal	31
4.2- Protocolo Nutricional.....	31
4.3- Tratamento com ivabradina	32
4.4- Preparo de Drogas e substâncias utilizadas.....	33
4.5- Confeção de cânulas venosas.....	34
4.6- Confeção de eletrodos para registro eletrocardiográfico	35
4.7- Cirurgias	35
4.7-1. <i>Canulação de veia jugular externa e implante de eletrodo</i>	35
4.8- Cuidados pós-operatórios.....	36
4.9- Registro de Eletrocardiograma.....	37
4.10- Protocolos Experimentais.....	37
4.10-1. <i>Avaliação da frequência cardíaca e controle autonômico cardiovascular na desnutrição proteica.</i>	37
4.11- Análise das Frequências Cardíacas de repouso e intrínseca	39
4.12- Análise do Controle Autonômico Tônico Cardíaco	39
4.12-1- <i>Efeito vagal</i>	39
4.12-2- <i>Efeito simpático</i>	39
4.12-3- <i>Análise do índice Simpato-vagal</i>	39
4.13- Peso relativo do ventrículo esquerdo.....	40
4.14- Análise Estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1- Efeito da ivabradina sobre o peso corporal em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.....	41

5.2- Efeito da ivabradina sobre a frequência cardíaca de repouso em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.....	42
5.3- Influência do tratamento com ivabradina sobre o controle autonômico da FC em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.	43
5.3.1- Influência da ivabradina sobre o efeito vagal.....	43
5.3.2- Influência da ivabradina sobre o efeito simpático	44
5.4- Efeitos da Ivabradina sobre a frequência cardíaca intrínseca em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.....	45
5.5- Efeitos do tratamento com ivabradina sobre o índice simpato-vagal em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.....	46
5.6- Efeito da ivabradina sobre o peso relativo do ventrículo esquerdo em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.....	47
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS.....	56

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1- Desnutrição

1.1-1. Conceito de Desnutrição

Desnutrição é uma síndrome clínica, de caráter social, de natureza multifatorial, caracterizada pela existência de um desequilíbrio entre o fornecimento de nutrientes e a demanda corporal que dificulta o funcionamento adequado do organismo (Ministério Da Saúde, 2005; Antwi, 2008).

Classicamente, a desnutrição é dividida em dois fenótipos clínicos distintos, marasmo e kwashiorkor. Embora o marasmo seja caracterizado pelo baixo peso para a altura, Z-score < -3, kwashiorkor apresenta uma classificação antropométrica de peso para idade inferior a 80% do peso, exibindo presença de edema bilateral, hepatomegalia, lesões cutâneas despigmentadas e alteração do aspecto capilar, causada pela deficiência de ingestão de proteínas (Heikens *et al.*, 2008; Heimbürger, 2009).

O suprimento de proteína dietética é essencial para manutenção da função e integridade celular, funções enzimáticas e hormonais, visto que, as proteínas são as únicas fontes dos aminoácidos essenciais (Lehninger *et al.*, 2005; Whitney e Rolfes, 2007).

1.1-2. Epidemiologia da Desnutrição

A pobreza mundial ainda é um dos problemas que mais contribuem para o desenvolvimento da desnutrição, e aproximadamente, 30% da população, principalmente idosos, adolescentes e crianças de países em desenvolvimento, apresentam algum tipo de subnutrição (WHO, 2000; FAO/WHO, 2004; FAO/WHO, 2005). A desnutrição atinge mais de 795 milhões de indivíduos em todo o mundo, incluindo 780 milhões em regiões em desenvolvimento (FAO/WHO 2015).

Apesar da prevalência de desnutrição ter exibido diminuição de 23,3% para 12,9% em vinte e cinco anos, continua sendo responsável por cerca de 3,5 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos de idade (Black *et al.*, 2008) (FAO/WHO, 2015). Um terço das crianças abaixo de cinco anos sofrem de desnutrição grave ou moderada em todo o mundo, sendo estas,

80% dos países asiáticos, 15% africanos, 5% latino-americanos (WHO 2000; FAO/WHO 2004; FAO/WHO 2005).

No Brasil, 10,5% das crianças com idade abaixo de 5 anos apresentam desnutrição moderada ou severa. De acordo com os dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS 2006), 7% das crianças nesta faixa etária apresentam desnutrição crônica. Quando verificados dados de crianças com idade entre cinco e nove anos, 4,1% apresentam desnutrição aguda (POF 2008-2009) e 6,8% apresentam desnutrição crônica (WHO, 2015). Desta forma, a erradicação da desnutrição deve permanecer como um importante compromisso em todo o mundo.

1.2- Desnutrição, comprometimento autonômico e remodelamento cardíaco

Múltiplos sistemas fisiológicos são afetados pela desnutrição, o que pode provocar o mau funcionamento de órgãos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças (Lucas, 1998). Contudo, a gravidade dessas patologias é dependente do período de exposição e da fase da vida na qual o indivíduo apresenta a deficiência nutricional (Lucas, 1998).

Diversos estudos já demonstraram que a utilização de ratos como modelo biológico para a pesquisa sobre carências nutricionais proporciona condições semelhantes as encontradas em humanos (Giacomelli e Marçal-Natali, 1999). Para induzir a desnutrição experimental podem ser empregados diferentes protocolos, como: diminuição do conteúdo proteico da dieta fornecido às fêmeas no período gestacional (Tonkiss *et al.*, 1998), redução do teor de proteína da dieta ofertado a fêmea durante a amamentação da prole (Pedrosa e Moraes-Santos, 1987) ou aumento do número de filhotes por ninhada, neste período (Bell e Slotkin, 1988). Outro método utilizado é a redução do conteúdo proteico da dieta após o desmame (Agarwal *et al.*, 1981; Benabe *et al.*, 1993; Tropia *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Gomide, 2007; Martins, 2007; Penitente *et al.*, 2007; Rodrigues, 2008; Fortes, L.H.S 2010; Silva *et al.*, 2013), sendo este o modelo adotado no presente trabalho.

A desnutrição imposta em fases importantes do desenvolvimento apresenta efeitos severos e permanentes ao organismo, deste modo, um insulto nutricional em período crítico da vida proporciona conseqüências neurológicas graves (Winick, 1970; Joshi *et al.*, 2003). Experimentos realizados em animais evidenciaram que a reduzida ingestão de proteínas em

fases iniciais da vida pode provocar alterações enzimáticas e modificar síntese e estrutura de proteínas e incorporação de lipídios (Kawaguchi e Hama, 1988; Levitsky e Strupp, 1995). Tais alterações, juntamente com transformações nos componentes envolvidos na maturação do cérebro, como produção sequencial de diferentes neurônios, poderão interromper o crescimento e a formação de circuitos neuronais (Morgane *et al.*, 2002b).

O comprometimento destas estruturas do SNC pela desnutrição promove déficits importantes no desenvolvimento cerebral e causa danos estruturais e funcionais como: alterações neurogênicas, na migração celular, diferenciação, sinaptogênese, plasticidade (Gressens *et al.*, 1997; Morgane *et al.*, 2002b; Rotta *et al.*, 2003; Bonatto *et al.*, 2005), e está associada a disfunções cardiovasculares centrais e periféricas (Cicogna *et al.*, 2001).

Os mecanismos de controle cardiovascular apresentam sistemas de feedback que atuam a longo e curto prazo (Shepherd e Mancina, 1986; Dampney, 1994). A regulação a longo prazo compreende os sistemas humorais, como sistema renina-angiotensina aldosterona (RAS), (Ferguson e Bains, 1997; Mendoza e Lazartigues, 2015). A regulação a curto prazo está relacionada aos reflexos cardiovasculares na qual as informações periféricas detectadas por receptores e processadas no sistema nervoso central (SNC) retornam à periferia por subdivisões eferente do sistema nervoso autônomo (SNA) (sistema nervoso simpático - SNS e sistema nervoso parassimpático - SNP), objetivando manter a homeostase (Machado *et al.*, 1997).

Estudos realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC) mostraram que os animais submetidos à restrição proteica (RP) pós-desmame, consumo de apenas 40% de proteína na dieta, por 35 dias, acomete o SNA. As alterações observadas no mecanismo de controle cardiovascular são: elevação da sensibilidade barorreflexa, do quimiorreflexo e do reflexo de Bezold-Jarisch (Tropia *et al.*, 2001; Penitente *et al.*, 2007); elevação da atividade do sistema renina-angiotensina (Gomide *et al.*, 2013); aumento da frequência cardíaca de repouso e pressão arterial média (PAM), bem como da variabilidade destes parâmetros ao se analisar no domínio do tempo (Oliveira *et al.*, 2004). Estudos também apontam para o aumento da atividade eferente simpática e diminuição da atividade eferente parassimpática cardíaca (Silva *et al.*, 2015). O bloqueio farmacológico dos receptores β -adrenérgicos reduz a FC de animais desnutridos e não apresenta efeito sobre a FC de animais submetidos a dietas padrões, sugerindo que a RP aumenta a atividade simpática eferente cardíaca. Contudo, a realização do bloqueio parassimpático por um antagonista do receptor muscarínico, aumenta a FC de repouso em animais alimentados com dieta padrão, mas não altera a FC de animais desnutridos, sugerindo que a desnutrição proteica pode reduzir a modulação vagal para a FC (Martins *et al.*, 2011;

Silva *et al.*, 2015). O desequilíbrio autonômico, no qual o sistema simpático está hiper-ativo e o sistema parassimpático hipo-ativo, apresenta associação com múltiplas condições patológicas, associadas a elevação da FC e PAM (Malliani *et al.*, 1994; Thayer e Lane, 2007).

O desequilíbrio autonômico pode ser explicado pela alteração na síntese ou liberação de neurotransmissores, bem como por agravos morfológicos no SNC alterando a modulação da atividade autonômica (Plagemann *et al.*, 2000; Pinos *et al.*, 2011; Penido *et al.*, 2012). Tais alterações podem se originar de transformações em importantes regiões do SNC associadas a produção ou modulação da atividade simpática, como áreas do hipotálamo, promovendo o desequilíbrio autonômico (Plagemann *et al.*, 2000; Barreto *et al.*, 2016). Assim, o desequilíbrio da atividade autonômica cardíaca está associado a uma elevada gama de alterações metabólicas, hemodinâmicas, tróficas e anormalidades reológicas cardiovasculares que contribuem para a elevação da FC e da PAM em animais submetidos a desnutrição, elevando o risco de morte súbita (Oliveira *et al.*, 2004).

Adicionalmente, tais processos patológicos da desnutrição podem estar associados a um prejuízo na performance miocárdica, uma vez que a restrição alimentar tem mostrado provocar remodelamento ventricular e disfunção cardíaca (Okoshi *et al.*, 2002; Gut *et al.*, 2003; Okoshi *et al.*, 2006).

Na medida em que as cardiopatias evoluem para a insuficiência cardíaca (IC) observam-se uma série de alterações morfofuncionais, chamadas de “Remodelamento cardíaco” (Brozena e Jessup, 2003). O remodelamento cardíaco baseia-se na presença de alterações na morfologia do ventrículo esquerdo, conferidas por um processo patológico, com importantes implicações nos ajustes funcionais cardíacos. O remodelamento cardíaco dá-se por fatores mecânicos, neuro-humorais e genéticos provenientes do surgimento ou da progressão da patologia instalada (Brozena e Jessup, 2003).

No processo de ocorrência do remodelamento cardíaco são detectadas transformações no diâmetro da cavidade ventricular, variações na massa do tecido, na espessura da parede e no formato do coração, bem como alterações fibróticas e inflamatórias que irão promover uma hipertrofia cardíaca e refletir em patologias clínicas (Cohn *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 2015). Tais adversidades podem ser ocasionadas por distensão mecânica, isquemia, mudanças na expressão gênica e proteica, alterações hormonais e em peptídeos vasoativos (Swynghedauw, 1999).

No início do processo de injúria, o remodelamento ventricular é um processo adaptativo favorável para a adequada manutenção das funções cardíacas, entretanto, a persistência destas anormalidades resultam em expansão da câmara ventricular, disfunção sistólica, função prejudicada da válvula mitral e insuficiência cardíaca sintomática (Ricardo e Leães, 2004). Deste modo, o benefício desta resposta adaptativa pode ser superado pelo efeito deletério na morfologia e função cardíacas, tornando o remodelamento cardíaco uma importante causa de morbidade e mortalidade.

Estudos têm mostrado que a restrição alimentar pós-natal provoca amplas perturbações cardíacas no que se refere ao desenvolvimento do remodelamento cardíaco, sugerido que a desnutrição estaria acarretando distúrbios no transporte intracelular de cálcio e no sistema beta-adrenérgico (Gut *et al.*, 2003).

A super-ativação do SNS também contribui para o procedimento de remodelamento cardíaco patológico (Cohn *et al.*, 1984). O aumento nos níveis sanguíneos de norepinefrina sugerem a presença do tônus simpático elevado, estando associado a hipertrofia cardíaca (Sutton e Sharpe, 2000), apoptose (Distefano e Sciacca, 2012) e expansão ventricular (Spinale, 2007).

A restrição alimentar compromete a função cardíaca ao prolongar o período de contração, apresentando aumento do conteúdo de colágeno no músculo cardíaco (Cicogna *et al.*, 2001). Okoshi e colaboradores em 2006 também observaram remodelamento e disfunção em miócitos de ratos espontaneamente hipertensos, submetidos a restrição alimentar (Okoshi *et al.*, 2006).

Em meio às alterações observadas nas doenças cardiovasculares, a hipertrofia cardíaca está fortemente associada ao progresso da IC, episódio de arritmias e risco de morte súbita (Grossman *et al.*, 1975; Lorell e Carabello, 2000). E essas alterações morfofuncionais, apresentadas em condições patológicas, estão associadas à superexpressão dos canais HCN (Fernández-Velasco *et al.*, 2003).

1.3- Canal HCN e Excitação Cardíaca

Esta família de canais, os HCNs – Canais catiônicos ativados por hiperpolarização e modulados por nucleotídeos cíclicos, foram descritos, primeiramente, em células do nodo

sinoatrial do coração, exercendo uma considerável função na geração do potencial de ação e no controle do marca-passo cardíaco e da frequência cardíaca (Brown *et al.*, 1979; Yanagihara e Irisawa, 1980; Brown e Difrancesco, 1980. ; Difrancesco, 1986; 1993). Posteriormente, estes canais foram identificados nas fibras de Purkinje (DiFrancesco, 1981), músculo atrial e ventricular (Yu *et al.*, 1993), bem como em uma diversidade de neurônios centrais e periféricos (Pape, 1996).

Até o momento, foram identificados quatro membros da família dos genes HCN em mamíferos, sendo eles HCN1, HCN2, HCN3 e HCN4 (Santoro *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1998; Santoro *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2001). As quatro isoformas dos canais HCN (HCN1-4) apresentam subunidades heterotetrâmeras (Accili *et al.*, 2002), que se modificam conforme a espécie e o tecido na qual está presente (Yasui *et al.*, 2001).

No tecido cardíaco se encontra presente o RNA das 4 isoformas do canal HCN: HCN2 exibem predominância no miocárdio ventricular e a isoforma HCN4 é mais transcrita no nodo sinoatrial (Baruscotti e Difrancesco, 2004; Mackiewicz *et al.*, 2014). Todas as isoformas do canal HCN são compostas por seis domínios transmembranares (S1-S6), estando presente no domínio S4 o sensor de voltagem. O poro do canal está formado entre os domínios S5 e S6, na qual uma sequência de GYG, típica de canais permeáveis para K⁺ poderia ser detectada. Na região C-terminal do peptídeo está presente o sítio de ligação para a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) (Difrancesco e Tortora, 1991; Scicchitano *et al.*, 2012).

O canal HCN é modulado por AMPC por meio da sua ação direta no próprio canal, diferentemente do que acontece a outros canais iônicos que são fosforilados. A ligação do AMPC aos canais HCN induz uma alteração conformacional da proteína, aumentando a possibilidade do canal permanecer aberto durante períodos de hiperpolarização. A ligação alostérica durante a configuração aberta do canal é favorável para a estabilidade da conformação de abertura (Difrancesco e Mangoni, 1994; Difrancesco, 1999).

A regulação dos canais HCN por AMPC apresenta papel importante no controle da frequência cardíaca (Difrancesco e Tortora, 1991). Em condições fisiológicas, há liberação do neurotransmissor pós-ganglionar simpático cardíaco, noradrenalina, que ao se ligar a receptores β -adrenérgicos 1 acoplados a proteína G alfa irá estimular o aumento da atividade da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, aumentar a concentração celular de AMPC. As elevadas concentrações de AMPC promovem o deslocamento da curva de ativação para potenciais menos

negativos. Como resultado, ocorre um aumento da inclinação da fase 4 do potencial de membrana das células marca-passo (despolarização diastólica lenta), permitindo que o potencial de membrana alcance o limiar mais rapidamente (Accili *et al.*, 1997; Difrancesco, 2006). Portanto, antecipa-se o potencial de ação, aumentando a frequência de disparos.

Ao contrário do neurotransmissor simpático, a ação do neurotransmissor pós-ganglionar parassimpático, a acetilcolina (ACh), estimula receptores muscarínicos que irão promover o deslocamento da curva de ativação para potenciais mais negativos. Consequentemente, haverá diminuição da inclinação da fase 4 (despolarização diastólica lenta), com prolongamento do intervalo entre os potenciais de ação e diminuição da frequência cardíaca (Accili *et al.*, 1997; Difrancesco, 2006). Deste modo, o SNA, por meio da estimulação beta-adrenérgica e colinérgica podem influenciar na duração do potencial de ação, alterando a frequência cardíaca (Difrancesco e Camm, 2004).

Contudo, diferentes recombinantes dos canais HCN apresentam respostas heterogêneas sobre a ligação do AMPc e a geração do potencial de ação. Dentre os genes HCN expressos de forma heteróloga, três deles apresentam características biofísicas distintas. Os canais HCN1, em períodos de hiperpolarização se ativam de forma relativamente rápida, em dezenas de milissegundos e apresentam uma pequena resposta ao AMPc (Santoro *et al.*, 1998). Os canais HCN2 são ativados de forma mais lenta, cerca de centenas de milissegundos, e são fortemente modulados por nucleotídeos cíclicos (Ludwig *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1999; Santoro e Tibbs, 1999). Por fim, a subunidade HCN4 é o canal com mais lenta ativação, podendo levar segundos para ser ativado. Contudo, apresenta uma forte resposta em presença de AMPc (Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999). Portanto, a compreensão dos mecanismos que originam a despolarização espontânea das células cardíacas, torna-se importante, pois é a despolarização diastólica lenta do potencial de membrana que concede a essas células a aptidão de gerar um batimento cardíaco, ou seja, agindo como um marca-passo natural do coração (Brown *et al.*, 1979).

Na despolarização espontânea do nodo sinoatrial, diferentes correntes iônicas estão envolvidas na eletrofisiologia da geração do potencial de ação, dentre elas: influxo de cálcio do tipo L (ICaL) e do tipo T (ICaT), corrente de sódio, potássio e corrente funny (If) (Monfredi *et al.*, 2010). A If foi assim denominada por apresentar características distintas das demais correntes iônicas cardíacas (Difrancesco, 2006). O canal HCN permite a passagem da If por meio do fluxo de íons sódio e potássio na célula, sendo responsável pelo evento espontâneo da despolarização da membrana, correspondente ao intervalo diastólico. Esta corrente torna-se

ativa em períodos de hiperpolarização, entre -45 mV e -65 mV e atinge a sua máxima amplitude em cerca de -100 mV, diferentemente das correntes já conhecidas, o que explica sua condutância para ambos os íons, Na⁺ e K⁺ (Difrancesco e Camm, 2004; Baruscotti *et al.*, 2005; Vaquero *et al.*, 2007). Assim, torna-se notório, que apenas uma pequena fração da If está ativada durante potenciais de membrana diastólica fisiológica (entre -65 e -40 mV) (Difrancesco e Camm, 2004).

Durante muito tempo tinha-se pensado que a função dos canais HCN no coração estava limitada as células que apresentam despolarização diastólica espontânea, sendo comumente aceito que estes canais não desempenhavam atividades na excitabilidade dos miócitos ventriculares. Em situações fisiológicas, os canais HCN são pouco expressos fora do sistema marca-passo e sistema de condução (Shi *et al.*, 1999; Stillitano *et al.*, 2008; Herrmann *et al.*, 2011). Entretanto, a baixa expressão dos canais HCN nos miócitos ventriculares é alterada em situações de patologias cardíaca. Na década de 1990, Cerbai e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a densidade da If estava aumentada nos cardiomiócitos hipertrofiados de ratos (Cerbai *et al.*, 1997).

Estudos tem mostrado uma super-regulação substancial da expressão dos canais HCN e da corrente If no miocárdio do ventrículo esquerdo em diferentes modelos animais de hipertrofia cardíaca e IC, bem como, em corações com insuficiência humana (Baruscotti e Difrancesco, 2004; Stillitano *et al.*, 2008). A super-regulação da If pode estar relacionada a automaticidade patológica no miocárdio ventricular esquerdo, desencadeando uma instabilidade do potencial de repouso da membrana, provocando aumento de correntes despolarizantes e aumentando a possibilidade de surgimento de batimentos prematuros (Stillitano *et al.*, 2008).

Despolarizações anormais são capazes de provocar uma antecipação dos batimentos cardíacos quando sua amplitude está alterada, ou na presença de potenciais de repouso instáveis (Nattel *et al.*, 2007; Marionneau *et al.*, 2008). Evidências clínicas revelam que a elevação da frequência cardíaca em pacientes com doenças do coração está associada a uma maior prevalência de morbimortalidade cardiovascular e sugerem que os fármacos que reduzem a FC proporcionam melhorias no desempenho do coração (Riccioni, 2011).

Assim, estudos recentes apontam que uma droga capaz de inibir corrente If, por meio do bloqueio dos canais HCN, pode ser terapêuticamente útil no tratamento de doenças cardíacas

por promover a diminuição da frequência cardíaca e a redução da morbidade e mortalidade (Riccioni, 2011).

1.4- Ivabradina – Bloqueador seletivo da If

Há mais de 20 anos vem sendo desenvolvidos medicamentos que bloqueiam seletivamente a corrente If das células do nodo sinoatrial, diminuindo a inclinação da despolarização diastólica lenta, aumentando o intervalo entre dois potenciais de ação sucessivos e reduzindo a frequência cardíaca (Vaquero *et al.*, 2007).

A ivabradina, fármaco inibidor específico da corrente If, foi a primeira droga aprovada pela Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos (EMA) para o tratamento de pacientes com angina crônica estável com função sinusal normal que apresentam contraindicação aos fármacos β -bloqueadores (Thollon *et al.*, 1994; Joannides *et al.*, 2006). A ação desse fármaco não altera a velocidade de condução ou a contratilidade cardíaca e não promove qualquer outro efeito sistêmico hemodinâmico oferecido por fármacos beta-bloqueadores, logo, a ivabradina é classificada como fármaco bradicárdico seletivo (Vaquero *et al.*, 2007).

A ivabradina apresenta um grupo benzacepinona e um grupo benzociclobutano unidos por uma cadeia azapentano, conforme podemos observar na figura 1. Por apresentar essa característica bioquímica se encontra na forma catiônica em pH fisiológico e possui coeficiente de partição de água/etanol de 0,95, propriedades que o torna hidrofílico (Vaquero *et al.*, 2007).

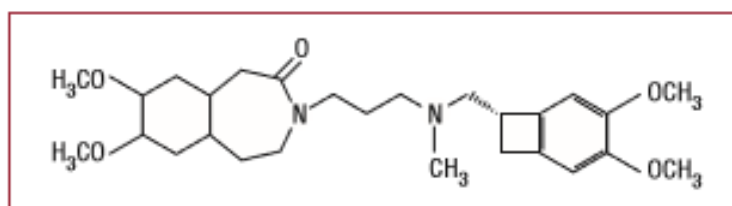


Figura 1: Estrutura química da Ivabradina. Fonte: (Vaquero *et al.*, 2007)

A ivabradina é metabolizada no fígado por meio da CYP3A4 do citocromo P450 e apresenta meia-vida de onze horas após administração crônica. Este fármaco é rapidamente eliminado do organismo, principalmente como metabólitos na urina e fezes. A depuração renal é de, aproximadamente, 70 ml/min, e excretada por via renal, em 4% da dose administrada, sem se biotransformar (Ragueneau *et al.*, 1998).

A ivabradina possui características de bloqueio seletivo e dependente da If, promovendo uma redução da inclinação da despolarização diastólica lenta, resultando em diminuição da atividade automática cardíaca e, conseqüentemente, da frequência cardíaca (Brown *et al.*, 1979; Difrancesco e Tortora, 1991; Bucchi *et al.*, 2002). Para bloquear a If, é necessário que a ivabradina atravesse a membrana da célula. No citoplasma, o fármaco possui acesso ao interior do canal HCN, atingindo a parte interna do poro e impedindo a passagem dos íons por meio dele (Bois *et al.*, 1996; Bucchi *et al.*, 2002). Deste modo, a ação da ivabradina no bloqueio da If se dá, somente, quando o canal HCN encontra-se em sua configuração aberta, isto é, durante períodos de hiperpolarização do potencial de ação e em períodos que há aumento da FC (Bucchi *et al.*, 2002; Difrancesco, 2005). Em voltagens próximas a zero, quando os canais estão fechados, não se observa nenhuma ação deste fármaco (Monnet *et al.*, 2001). Portanto, acredita-se que a atuação da ivabradina sobre a If é voltagem dependente, uma vez que estes canais se encontram menos ativados em potenciais fisiológicos e mais ativados durante a hiperpolarização (Bois *et al.*, 1996; Bucchi *et al.*, 2002; Yaniv *et al.*, 2015). Deste modo, o bloqueio dos canais HCN dependente da frequência cardíaca apresenta relevância clínica significativa, uma vez que sua eficácia será maior em pacientes com taquicardia, apresentando risco reduzido de desenvolver bradicardia (Bois *et al.*, 1996; Borer, 2004; Difrancesco e Camm, 2004).

Sabe-se que, em concentrações terapêuticas, a ivabradina não atua bloqueando correntes iônicas envolvidas no automatismo do nodo sinoatrial, como corrente de Ca^{+2} , Na^{+} e K^{+} . Fato que explica o motivo pelo qual a ivabradina não modifica a velocidade de condução intracardíaca ou a duração do potencial de ação e dos períodos refratários atrial e/ou ventricular (Brown *et al.*, 1979; Bois *et al.*, 1996; Difrancesco e Camm, 2004).

Embora seja um inibidor seletivo do canal HCN proporcionando redução da frequência cardíaca, a ivabradina também apresenta impactos positivos sobre o remodelamento ventricular esquerdo. A ivabradina reduz a disfunção sistólica e diastólica, diminui a hipertrofia ventricular esquerda, fibrose, inflamação e apoptose (Becher *et al.*, 2012).

Estudos apontam que a ivabradina reduziu de forma importante a expressão de RNAm dos canais HCN e do peptídeo natriurético atrial, que exercem funções importantes no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, assim, a ivabradina reduziu a razão entre a massa do ventrículo esquerdo e o peso corporal, marcador de hipertrofia ventricular esquerda (Becher *et al.*, 2012).

Portanto, a ação da ivabradina sobre os canais HCN tem apresentado impactos positivos no controle da frequência cardíaca e remodelamento ventricular esquerdo, possibilitando uma diminuição dos riscos de arritmias e morte súbita.

2. JUSTIFICATIVA

A desnutrição imposta em fases importantes do desenvolvimento apresenta efeitos severos e permanentes ao organismo, comprometendo o sistema de controle autonômico cardiovascular. O SNA modula a ativação dos canais HCN, por meio da sua ação sobre a concentração de AMPc intracelular e contribui para a reorganização morfofuncional do miocárdio (adaptações características de IC).

Estudos em ratos demonstraram elevação da If em corações hipertrofiados ou com IC. A If é essencial para a despolarização espontânea da membrana das células e, a presença de remodelamento cardíaco estrutural pode ser um substrato para a arritmogênese, taquicardia e morte súbita na desnutrição proteica.

Sabendo que a ivabradina, fármaco que bloqueia os canais HCNs, é capaz de reduzir a FC por meio da diminuição da If e contribuir para a melhora do remodelamento cardíaco em corações hipertrofiados e com IC, torna-se relevante o estudo da ação deste fármaco sobre as alterações autonômicas cardíacas observadas na desnutrição proteica.

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

- Avaliar o efeito da ivabradina sobre o controle autonômico tônico da frequência cardíaca e o remodelamento ventricular esquerdo de ratos submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.

3.2- Específicos

- Avaliar a influência da ivabradina sobre os níveis de frequência cardíaca de repouso em animais controle e submetido à desnutrição proteica.

- Avaliar a influência da ivabradina sobre o efeito vagal em animais controle e submetido à desnutrição proteica.

- Avaliar a influência da ivabradina sobre o efeito simpático em animais controle e submetido à desnutrição proteica.

- Avaliar a influência da ivabradina sobre os níveis de frequência cardíaca intrínseca em animais controle e submetido à desnutrição proteica.

- Avaliar a influência da ivabradina sobre o índice simpato-vagal de animais controle e submetido à desnutrição proteica.

- Avaliar a influência da ivabradina sobre o peso relativo do ventrículo esquerdo, em animais controle e submetido à desnutrição proteica.

4. METODOLOGIA

4.1- Modelo Animal

Neste trabalho foram utilizados ratos Fisher, fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos no biotério desta instituição, em regime de temperatura média de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e à dieta.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), por meio do protocolo número 2015/39. Todas as normas estabelecidas por esta comissão foram respeitadas, de forma a minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos.

4.2- Protocolo Nutricional

Após o desmame, realizado aos 28 dias, os animais machos da ninhada foram divididos em dois grupos e submetidos aos seguintes protocolos nutricionais por um período de 35 dias:

Grupo Controle (GC): receberam dieta comercial Labcil/Socil® contendo 15% de proteína (dieta controle) e água filtrada *ad libitum*.

Grupo Desnutrido (GD): receberam dieta semi-purificada contendo 6% de proteína (dieta hipoproteica) e água filtrada *ad libitum*. O presente protocolo nutricional já está padronizado e validado por nosso grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2015).

Conforme a escolha do modelo animal, e por serem classificados como roedores, optamos por utilizar ração pelletizada. As dietas empregadas nos grupos experimentais diferiram apenas quanto ao teor proteico. A composição química das dietas está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição Química das Dietas Controle e Hipoproteica (g/100g de dieta)

Ingredientes	Dieta Controle	Dieta Hipoproteica
Proteína (Caseína)	15	6
Amido de Milho	70	79
Óleo de Soja	8	8
Mix de Sais	5	5
Mix de Vitamina	1	1
Fibra (Celulose)	1	1
Teor Calórico	412 Kcal	412 Kcal

Mistura de minerais (g/Kg de mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO₄.7H₂O – 57,3 / CaCO₃ – 381,4 / MnSO₄.H₂O – 4,01 / FeSO₄.7H₂O – 27,0 / ZnSO₄.7H₂O – 0,548 / CuSO₄.5H₂O – 0,477 / CoCl₂.6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0.

Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Acetato de retinol – 0,6 / Colecalciferol – 0,005/ Ácido paminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80/ Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / α -Tocoferol – 6,7.

Fonte: (Tropia *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2015).

4.3- Tratamento com ivabradina

Após o período de 35 dias recebendo dieta específica, os animais foram novamente divididos em 4 grupos experimentais e tratados por 8 dias consecutivos com ivabradina na dose de 1mg/kg/mL, i.p. ou submetidos à injeção de PBS na dose de 1mL/Kg i.p. Os animais foram divididos em: Controle Ivabradina (GC-IVA), Controle PBS (GC-PBS), Desnutrido Ivabradina (GD-IVA) e Desnutrido PBS (GD-PBS). Neste período os animais continuaram recebendo a dieta previamente estabelecida e água à vontade. No 7º e 8º dia de tratamento os animais foram submetidos aos protocolos experimentais conforme será explicado adiante.

O cronograma do protocolo nutricional e injeção de ivabradina e PBS está representado na Figura 2 (A e B).

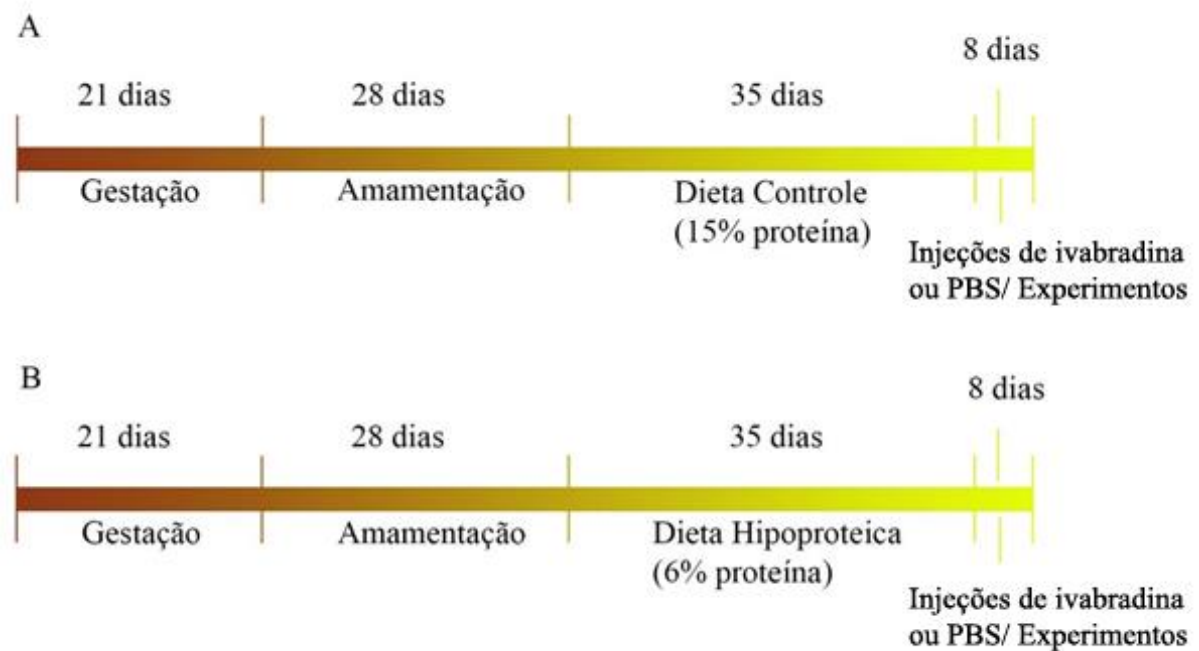


Figura 2 - A e B: Protocolo de desnutrição proteica e injeção de ivabradina ou PBS. Após o nascimento, os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, foram divididos em dois grupos: grupo controle (dieta padrão com 15% de proteína) e grupo desnutrido (dieta hipoproteica com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período, os animais foram submetidos a injeção de ivabradina ou PBS por 8 dias consecutivos e utilizados para experimentação neste período.

4.4- Preparo de Drogas e substâncias utilizadas

PBS (Salina tamponada com fosfato; pH 7,2): solução preparada pela diluição de 8,18g de NaCl P.A., 1,98g de Na₂HPO₄.7H₂O P.A. e 0,26 g de NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Synth, LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP) em água ultra purificada (Milli – Q®) q.s.p. 1000mL. Ajustou-se o pH da solução para 7,2 com soluções de HCl e NaOH, conforme necessidade. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C e 1,0Kg/cm² durante 15 minutos, conforme protocolo em vigor no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (Silva *et al.*, 2013).

Anestésico (Solução de Ketamina + Xilazina): solução preparada pela adição de 2,5mL de Xilazina 2% (p/v) a 10mL de Ketamina 10% (p/v). Utilizada da seguinte forma: dose (ketamina: 80mg/kg; Xilazina: 7mg/kg) e volume (0,1mL/100g do animal; i.m.) (Silva *et al.*, 2013).

Anti-inflamatório [Ketoflex 1% p/v (Cetoprofeno)]: empregado com o objetivo de reduzir inflamação e dor decorrente dos procedimentos cirúrgicos. Utilizado da seguinte forma: dose de 4mg/Kg e volume injetado de 0,1mL/300g do animal; i.m. (Silva *et al.*, 2013).

Antibiótico (Pentabiótico Veterinário): utilizado na prevenção de infecções, na seguinte dose: 48.000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina/kg. Volume injetado: 0,1mL/100g de animal; i.m. (Silva *et al.*, 2013).

Metil-atropina: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se 44,8 mg de Brometo de metil-atropina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 22,4 mL de salina (dose 2mg/mL). A solução foi protegida da luz para evitar degradação, dividida em alíquotas de 1 mL armazenada em tubos de polietileno Eppendorf, a -20°C até o momento do uso. Foi injetada na dose de 2mg/kg, volume de 1mL/Kg de peso do animal; i.v., conforme preconizado por Barros (2014) (Barros *et al.*, 2014).

Metoprolol: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se 44,8 mg de Tartarato de Metoprolol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 22,4 mL de salina (dose: 2mg/mL). A solução foi protegida da luz para evitar degradação, dividida em alíquotas de 1 mL armazenada em tubos de polietileno Eppendorf, a -20°C até o momento do uso. Foi injetada na dose de 2mg/kg, volume de 1mL/Kg de peso do animal; i.v., conforme utilizado por Martins (2011) (Martins *et al.*, 2011).

Ivabradina: A solução de Ivabradina foi preparada dissolvendo 7,5mg Ivabradina (Procoralan) em 7,5ml de solução PBS (dose: 1mg/mL). A solução foi prepara a cada dois dias e mantida sob refrigeração até o momento de utilização, para evitar a degradação. A droga foi injetada na dose de 1mg/kg, no volume de 1ml/Kg de peso do animal; i.p..

4.5- Confeção de cânulas venosas

Para confecção das cânulas venosas foram utilizados cateteres de polietileno PE-50 previamente soldados a tubos de polietileno PE-10 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD). As dimensões das cânulas foram ajustadas de acordo com os grupos dos animais (GC e GD), conforme apresentado na tabela 2. As cânulas foram preenchidas com heparina e a extremidade de PE-50 foi obstruída com pino de metal esterilizado (Silva *et al.*, 2013).

Tabela 2: Confeção de Cânula veia Jugular.

	Controle		Desnutrido	
	PE50	PE10	P50	P10
Veia	10cm	1cm	8cm	0,5cm

4.6- Confeção de eletrodos para registro eletrocardiográfico

Para a confecção dos eletrodos, utilizou-se conectores soquete torneado de 6 pinos DIP que foram separados para confeccionar dois conectores de 3 pinos. Cada conector de 3 pinos foi soldado a fios de cobre finos, flexíveis e encapados, e posteriormente, foram integrados ao conector do sistema para obtenção do ECG. O esquema do conector utilizado está representado na figura 3.



Figura 3 : Imagem de um conector soquete torneado de 3 pinos DIP conectado aos fios de cobre, Fio 1, fio 2 (terra), fio 3. O posicionamento dos fios está descrito detalhadamente no item 4.7.

4.7- Cirurgias

4.7-1. *Canulação de veia jugular externa e implante de eletrodo*

Para realização dos procedimentos de canulação da veia jugular externa e implante de eletrodo, os animais foram anestesiados com solução anestésica de Ketamina e Xilazina (i.m). Posteriormente, os mesmos foram tricotomizados na região do pescoço, dorso e do tórax, seguida da assepsia destes locais com PVPI degermante. Mediante uma pequena incisão na raiz do pescoço, acima da clavícula, a veia jugular externa foi identificada e, em seguida, exposta (Figura 4). A cânula venosa foi inserida na veia jugular externa. Em seguida, a outra

extremidade da cânula foi exteriorizada no dorso do animal com o auxílio de um pequeno tubo de metal (trocáter), essa disposição permitiu a posterior administração de drogas com livre movimentação do animal.

Logo após, implantou-se o eletrodo para registro do eletrocardiograma (ECG) na região do tórax previamente tricotomizada. Foi realizada uma incisão longitudinal de aproximadamente 1cm na região do esterno. Através da incisão no dorso do animal, os fios identificados como 1 e 3 foram cuidadosamente transpassados subcutaneamente próximo à axila esquerda e foram suturados junto ao terço lateral dos músculos peitorais esquerdo e direito. Ambos formaram uma linha na horizontal, constituindo uma derivação do triângulo de Einthoven. O fio 2, não transpassado para a região peitoral, foi fixado junto à musculatura da região dorsal e utilizado como fio terra (Figura 4). Após os procedimentos cirúrgicos os locais de incisão foram cuidadosamente suturados (Silva *et al.*, 2013).

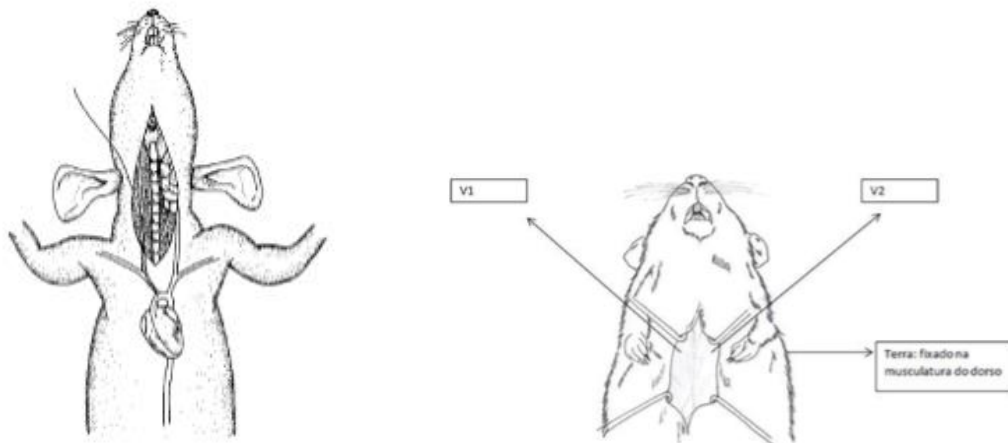


Figura 4 : Desenho esquemático da canulação da veia jugular externa e implante de eletrodos para a aquisição do sinal eletrocardiográfico (Fortes, L.H.S., 2010).

4.8- Cuidados pós-operatórios

Após o procedimento cirúrgico, foi administrado Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge, São Paulo, Brasil - 0,1 mL/100g; i.m.) e Ketoflex (Biofen, 1% p/v (Cetoprofeno); 0,1ml/300g) para ação antibiótica e anti-inflamatória profilática, respectivamente (Silva *et al.*, 2013). Os ratos foram alocados em gaiolas individuais e mantidos sobre manta térmica até a recuperação completa do efeito do anestésico, a fim de evitar hipotermia. Posteriormente, os animais foram mantidos na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído

controlados, recebendo dieta previamente estabelecida e água *ad libitum*. Os mesmos permaneceram em recuperação por 48hrs para subsequente realização do ECG.

4.9- Registro de Eletrocardiograma

Inicialmente, os animais foram alocados em uma gaiola de acrílico revestida com tela metálica fina (gaiola de Faraday) e permaneceram em adaptação ao ambiente por um período de, aproximadamente, 30 minutos. Os registros foram realizados na mesma faixa de horário, entre 8 e 17hs. Para a realização do registro de ECG os eletrodos foram conectados a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/20 – ADInstruments). Por meio de um software (LabChart 7.3.4 for Windows), o sinal captado foi registrado como sinal bruto, medido por unidades arbitrárias e simultaneamente convertido em sinal integrado para obtenção do eletrocardiograma. A partir do registro de ECG, foi calculada a FC. A figura 5 apresenta um exemplo da janela do LabChart 7.3.4.

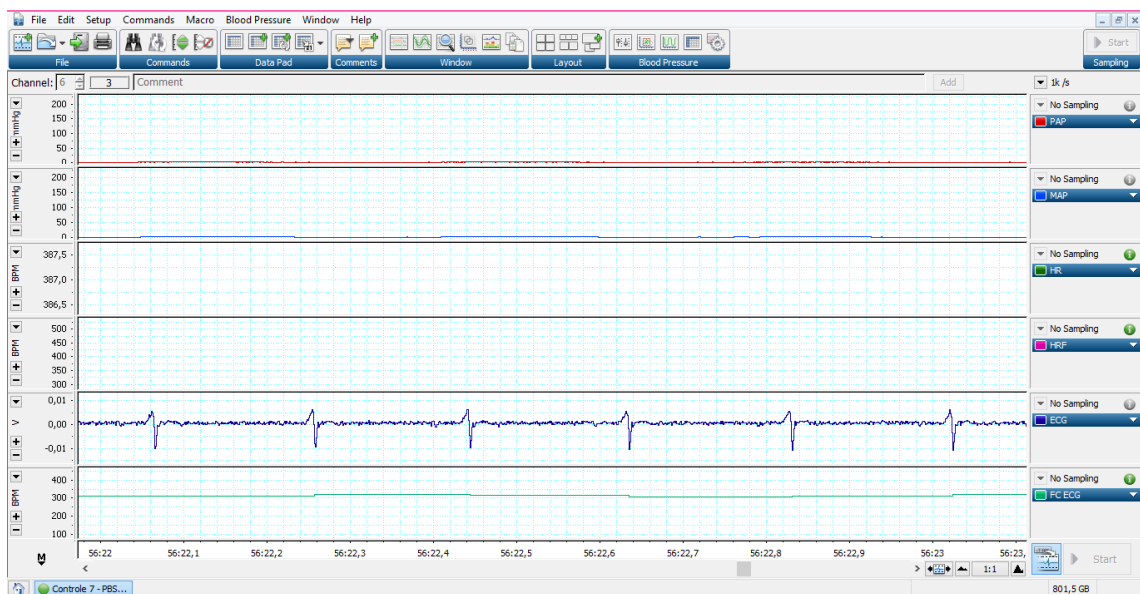


Figura 5 : Representação da janela de visualização do software LabChart durante o registro eletrocardiográfico e FC. Canais de registro: 5- ECG, 6- FC.

4.10- Protocolos Experimentais

4.10-1. Avaliação da frequência cardíaca e controle autonômico cardiovascular na desnutrição proteica.

Para avaliar o efeito da ivabradina na atividade autonômica cardíaca em animais com desnutrição proteica, foi utilizado nitrato de metil atropina com o objetivo de bloquear os receptores muscarínicos e metoprolol com a finalidade de bloquear os receptores β -adrenérgicos em animais tratados com ivabradina ou PBS.

Os experimentos foram realizados no sétimo e oitavo dia de tratamento para avaliar os parâmetros cardiovasculares. Inicialmente, os animais foram tratados conforme seus respectivos grupos (IVA ou PBS na dose de 0,1ml/100g i.p.) e após 30 minutos da aplicação do fármaco foi realizado o registro de ECG para obtenção da FC de repouso (D'souza *et al.*, 2014), por um período de 30 minutos. Logo após, nitrato de metil-atropina (2mg/kg/mL) foi administrado por via intravenosa (iv) para o bloqueio da ação parassimpática sobre o coração, seguida de 15 minutos de registro de ECG. Após esse período, foi administrado o metoprolol (2mg/kg/mL), também por via i.v. para o bloqueio do sistema nervoso simpático, seguida da realização do registro de ECG por mais 15 minutos. Em metade dos animais, para cada grupo experimental, a ordem do bloqueio autonômico foi invertida, ou seja, metoprolol foi administrado antes do nitrato de metil-atropina. A aplicação do segundo fármaco (Metoprolol ou metil-atropina) permitiu a realização do duplo bloqueio autonômico, obtendo-se a frequência cardíaca intrínseca (FCi) (Silva *et al.*, 2016).

Os valores de frequência cardíaca antes e após o bloqueio autonômico com nitrato de metil-atropina ou metoprolol foram utilizados para calcular o efeito autonômico simpático e parassimpático e a FCi de marca-passo foi realizada após o duplo bloqueio autonômico, posterior ao tratamento com ivabradina (Silva *et al.*, 2016). A escala temporal está representada na Figura 6.

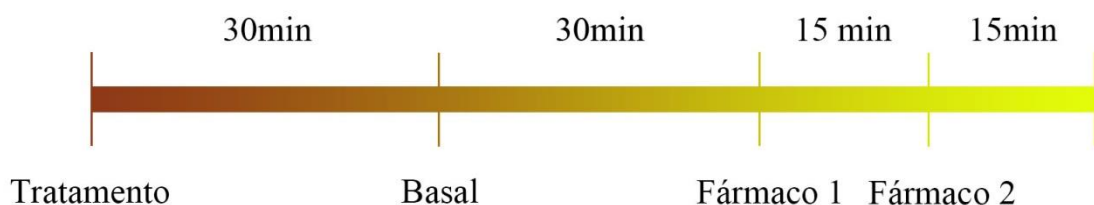


Figura 6 : Escala temporal do protocolo experimental para avaliação do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares em animais controle e desnutrido submetidos a injeção de ivabradina ou PBS (1mg/kg) durante o registro de ECG. Fármaco 1: Nitrato de metil-atropina (2mg/kg/mL). Fármaco 2: Metoprolol (2mg/kg/mL). Em metade dos animais os fármacos foram administrados na ordem representada (1 e 2). Na outra metade a ordem dos fármacos foi invertida.

4.11- Análise das Frequências Cardíacas de repouso e intrínseca

Para análise da frequência cardíaca de repouso, obtida por meio do ECG, foi realizada a média do último minuto do registro antes da aplicação da primeira droga para o bloqueio autonômico.

A FC_i foi obtida após a aplicação da segunda droga (metoprolol ou metil-atropina) e realização do duplo bloqueio autonômico, no qual foi analisada a média de 1 minuto da FC também ao final do registro (Silva *et al.*, 2016).

4.12- Análise do Controle Autonômico Tônico Cardíaco

4.12.1- Efeito vagal

O efeito vagal foi calculado por meio da subtração da média de 1 minuto ao final do registro da FC após a aplicação de Metil-atropina e a média de 1 minuto ao final do registro da FC de repouso (Silva *et al.*, 2016).

4.12.2- Efeito simpático

O efeito simpático foi calculado por meio da subtração da média de 1 minuto ao final do registro da FC após a aplicação de Metoprolol e a média de 1 minuto ao final do registro da FC de repouso (Silva *et al.*, 2016).

4.12.3- Análise do índice Simpato-vagal

O índice simpato-vagal (ISV) foi calculado dividindo-se o valor da média da FC de repouso pelo valor da média da FC_i (Silva *et al.*, 2016).

4.13- Peso relativo do ventrículo esquerdo

Após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com solução anestésica de ketamina e xilazina i.m.. Em seguida, foi realizada a toractomia e a retirada do coração. O órgão foi lavado em salina 0,9%, seguida da separação e pesagem do VE. O cálculo do peso relativo do ventrículo esquerdo foi realizado por meio da razão entre o peso do ventrículo esquerdo (mg) e o peso corporal do animal (g), sendo o resultado obtido em mg/g. A análise do peso relativo do ventrículo esquerdo é um indicador de remodelamento ventricular (Penitente *et al.*, 2013).

4.14- Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do teste anova two-way, seguida do pós teste Newman-Keuls. Foi considerado nível de significância $P < 0,05$ (95% de intervalo de confiança). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados por meio do programa GraphPad Prism, versão 6.00.

5. RESULTADOS

5.1- Efeito da ivabradina sobre o peso corporal em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.

A restrição proteica por um período de 35 dias acarretou um peso corporal significativamente menor nos animais submetidos à desnutrição proteica pós-desmame em comparação aos animais do grupo controle (**GD-PBS** = $73,82\text{g} \pm 2,062$ vs. **GC-PBS** = $227,7\text{g} \pm 6,031$; $p < 0,0001$). Contudo, após o tratamento com ivabradina, os animais do GD-IVA não apresentaram diferença significativa no peso corporal em relação aos animais do GD-PBS (**GD-PBS** = $73,82\text{g} \pm 2,062$ vs. **GD-IVA** = $71,38\text{g} \pm 2,814$; $p = 0,1776$). No grupo controle, os animais tratados com ivabradina e os que foram submetidos a injeção com PBS também não apresentaram alteração significativa de peso corporal (**GC-PBS** = $227,7\text{g} \pm 6,031$ vs. **GC-IVA** = $217,9\text{g} \pm 4,450$; $p = 0,1776$), conforme observado na figura 7.

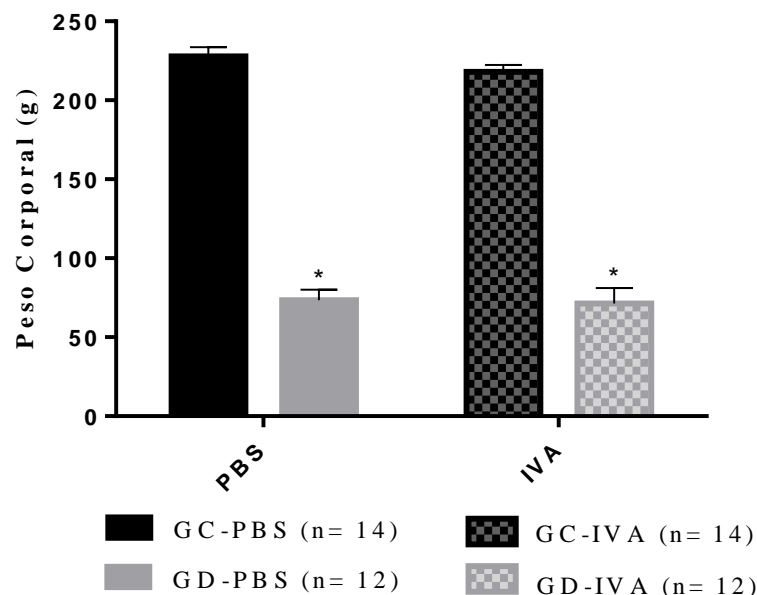


Figura 7: Efeito da ivabradina sobre o peso corporal (g) dos animais controles e desnutridos. As barras representam média ± EPM; * Diferença estatística em relação ao grupo controle PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.2- Efeito da ivabradina sobre a frequência cardíaca de repouso em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.

Na análise de frequência cardíaca de repouso foi observado um aumento significativo dos seus níveis nos animais do GD-PBS em comparação ao GC-PBS (**GD-PBS**= 438,8bpm \pm 10,76 vs. **GC-PBS**= 347,0bpm \pm 7,771; $p < 0,0001$). Contudo, os animais do GD-IVA apresentaram uma diminuição significativa da FC de repouso em comparação ao GD-PBS (**GD-PBS**= 438,8 bpm \pm 10,76 vs. **GD-IVA**=344,4 bpm \pm 6,571; interação $F(1, 25) = 8,486$; $p = 0,0074$), atingindo níveis semelhantes aos animais do GC-PBS (**GC-PBS**= 347,0 bpm \pm 7,771), como pode ser observado na figura 8.

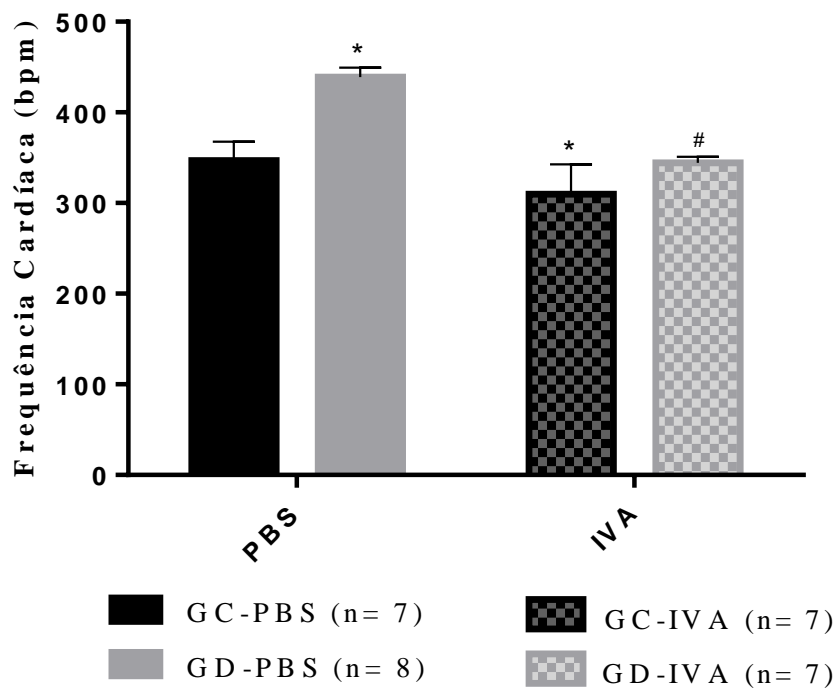


Figura 8: Efeito da ivabradina sobre a frequência cardíaca de repouso dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.3- Influência do tratamento com ivabradina sobre o controle autonômico da FC em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame.

5.3.1- Influência da ivabradina sobre o efeito vagal

O efeito vagal indica a ação do SNP sobre a FC de repouso. O bloqueio dos receptores muscarínicos com Metil-atropina, não promoveu alteração da FC nos animais do GD-PBS, contudo aumentou significativamente a FC nos animais do GC-PBS (**GD-PBS**= $\Delta 7,833\text{bpm} \pm 1,621$ vs. **GC-PBS**= $\Delta 66,5\text{bpm} \pm 12,28$; $p= 0,0051$).

Contudo, os animais do GD-IVA apresentaram aumento significativo da FC de repouso em comparação ao GD-PBS (**GD-IVA**= $\Delta 45,86 \pm 8,016$ vs. **GD-PBS**= $\Delta 7,833\text{bpm} \pm 1,621$; interação: $F(1, 20) = 10,79$; $p= 0,0037$) após o bloqueio vagal. Exibindo uma variação da FC de repouso semelhante ao encontrado nos animais do GC-PBS (**GC-PBS**= $\Delta 66,50 \pm 12,28$), conforme observado na figura 9.

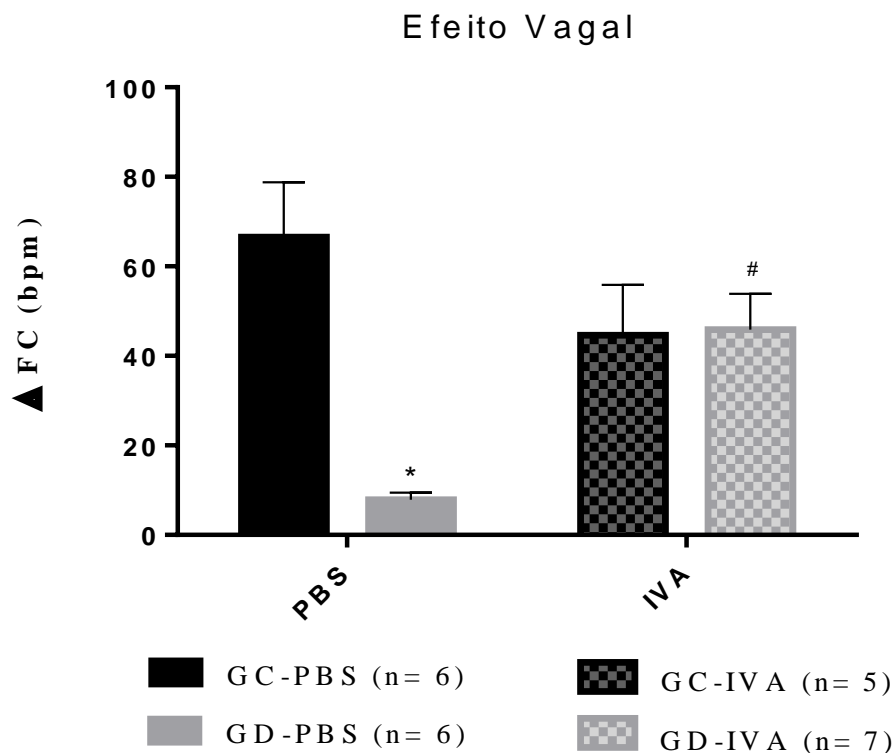


Figura 9: Influência da ivabradina sobre o efeito vagal cardíaco dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.3.2- Influência da ivabradina sobre o efeito simpático

A análise do efeito simpático mostra a ação do sistema nervoso simpático sobre a FC de repouso. Após o bloqueio β -adrenérgico com Metoprolol houve uma diminuição significativa dos níveis de FC nos animais do GD-PBS em comparação aos animais do GC-PBS (**GD-PBS**= Δ -68,67bpm \pm 10,15 vs. **GC-PBS**= Δ -34,83bpm \pm 5,759; $p= 0,0097$).

No entanto, nos animais do GD-IVA, a queda da FC foi significativamente menor que a queda observada nos animais do GD-PBS (**GD-IVA**= -50,50 \pm 7,597 vs. **GD-PBS**= Δ -68,67bpm \pm 10,15; interação: $F(1, 20) = 4,506$; $p= 0,0465$) após o bloqueio simpático, alcançando valores similares aos observados nos animais do GC-PBS (**GC-PBS**= -34,83 \pm 5,759), como pode ser observado na figura 10.

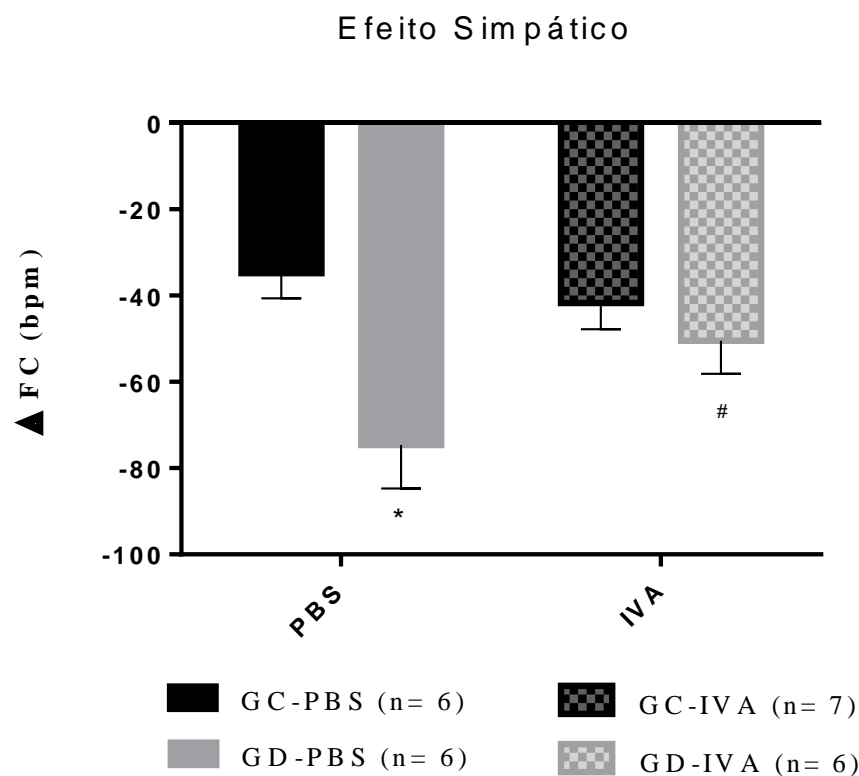


Figura 10: Influência da ivabradina sobre o efeito simpático cardíaco dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.4- Efeitos da Ivabradina sobre a frequência cardíaca intrínseca em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame

Após o duplo bloqueio autonômico com Metil-atropina e Metoprolol, obtém-se a FCi. De acordo com os dados apresentados na figura 11, é possível observar uma redução significativa da FCi nos animais do GC-IVA, em comparação aos animais do GC-PBS (**GC-IVA**= 281,5bpm \pm 9,525 vs. **GC-PBS**= 345,7bpm \pm 8,663; $p= 0,0007$), bem como, uma diminuição significativa da FCi dos animais do GD-IVA, em comparação aos animais do GC-PBS e GD-PBS (**GD-IVA**= 274,4bpm \pm 16,03 vs. **GC-PBS**= 345,7bpm \pm 8,663; **GD-IVA**= 274,4bpm \pm 16,03 vs. **GD-PBS**= 327,2bpm \pm 21,90; $p= 0,0007$).

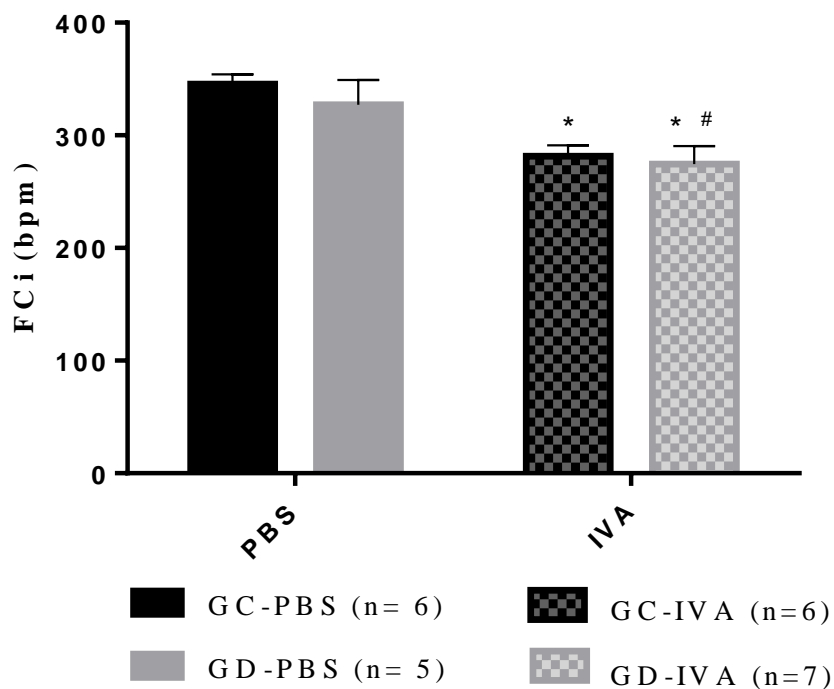


Figura 11: Influência da ivabradina sobre a frequência cardíaca intrínseca dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p < 0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.5- Efeitos do tratamento com ivabradina sobre o índice simpato-vagal em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame

A análise do ISV avalia a modulação autonômica cardíaca. De acordo com os dados apresentados na figura 12 é possível observar diferença significativa do ISV entre os animais do GC-PBS e GD-PBS (**GC-PBS**= $0,9653 \pm 0,02926$ vs. **GD-PBS**= $1,354 \pm 0,05575$; $p < 0,0001$). Contudo, nos animais do GD-IVA é possível observar uma diminuição significativa do ISV, em comparação aos animais do GD-PBS (**GD-IVA**= $1,107 \pm 0,02703$ vs. **GD-PBS**= $1,354 \pm 0,05575$; interação entre tratamento e estado nutricional: $F(1, 20) = 9,089$; $p = 0,0068$).

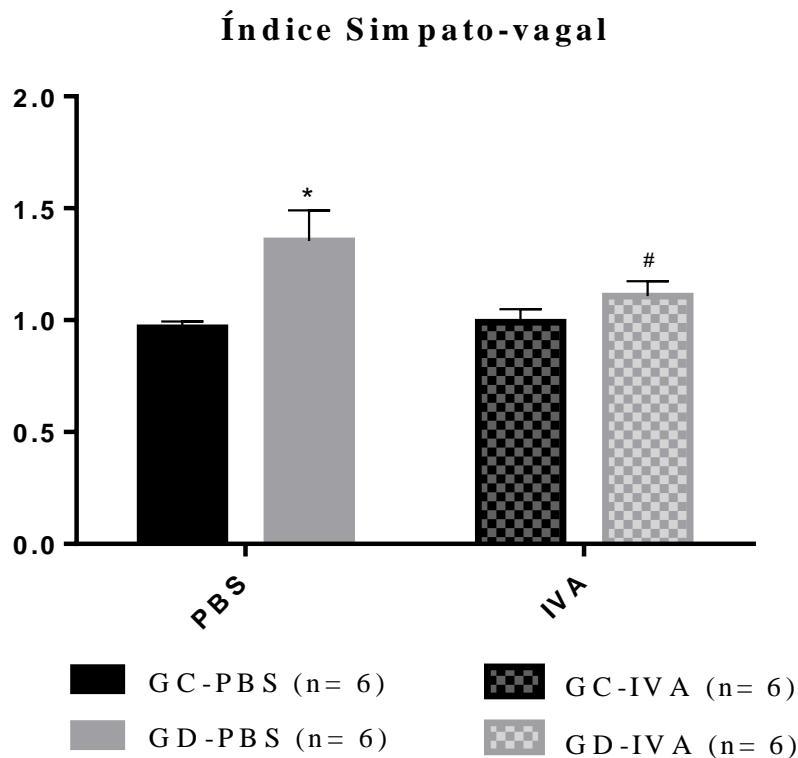


Figura 12: Ação da ivabradina sobre o Índice Simpato-vagal dos animais controles e desnutridos. As barras representam média ± EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupo Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupos Desnutrido PBS (p<0,05, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

5.6- Efeito da ivabradina sobre o peso relativo do ventrículo esquerdo em ratos controles e submetidos à desnutrição proteica pós-desmame

Os animais do GD-PBS apresentaram peso relativo do VE significativamente maior quando comparado ao GC-PBS (**GD-PBS**=3,081mg/g vs. **GC-PBS**=1,986mg/g; $P<0,0001$). No entanto, o GD-IVA apresentou redução significativa do peso relativo do ventrículo esquerdo em comparação aos animais do GD-PBS (**GD-PBS**=3,081mg/g vs. **GD-IVA**=2,842mg/g; interação $F(1, 31) = 5,923$; $p = 0,0209$), como observado na figura 13.

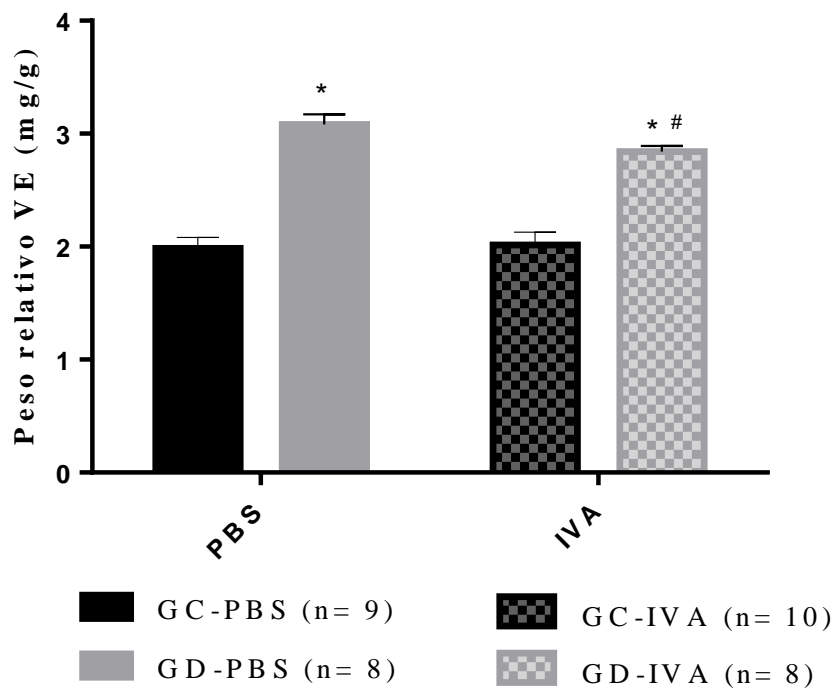


Figura 13: Efeito da ivabradina sobre o peso relativo do ventrículo esquerdo (mg/g) dos animais controles e desnutridos. As barras representam média \pm EPM; * Diferença estatística em relação ao Grupos Controle PBS e # Diferença estatística em relação ao Grupo Desnutrido PBS ($p<0,05$, Anova two-way, pós-teste de Newman-Keuls).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos os efeitos do tratamento crônico com ivabradina sobre as alterações fisiológicas provocadas pela desnutrição, como: (i) diminuição da FC em animais desnutridos após o tratamento com ivabradina; (ii) reversão das alterações autonômicas cardíacas em animais desnutridos tratados com ivabradina; (iii) melhora do peso relativo do ventrículo esquerdo em animais desnutridos tratados com ivabradina, observando, assim, a melhora de tais alterações cardíacas na desnutrição após o tratamento com o fármaco.

Inicialmente, após 35 dias de restrição proteica, avaliamos o peso corporal dos animais e observamos que em animais desnutridos o peso corporal foi significativamente menor que em animais do grupo controle. A diferença de peso observada entre os grupos aponta a eficiência da dieta em promover a desnutrição. A desnutrição proteica em estágios iniciais da vida pode gerar um comprometimento irreversível do processo de proliferação celular, o que causa prejuízos no desenvolvimento corporal dos animais, promovendo a depleção da massa muscular e perda de peso (Benabe *et al.*, 1993; Martinez-Maldonado *et al.*, 1993). A perda de peso pós-parto é considerada um indicador primário de desnutrição e, de fato, mostra os impactos sobre os processos de divisão celular frente a uma resposta de insulto nutricional (Lucas, 1998).

Corroborando esses achados, diferentes autores demonstraram um déficit de aproximadamente 70% no peso corporal de ratos submetidos ao mesmo protocolo de desnutrição proteica (Penitente *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Em humanos, a desnutrição proteica nos primeiros períodos da vida promove crescimento inadequado, com presença de menor estatura e peso para a idade. Assim, os resultados relacionados ao peso corporal de animais submetidos a restrição proteica se correlacionam a estudos realizados com humanos. Portanto, os dados mostram que o menor ganho de peso na desnutrição proteica corrobora dados da literatura, sugerindo que o consumo inadequado de proteínas na dieta não permite o aporte suficiente de aminoácidos para o desenvolvimento normal do organismo (Lucas, 1998).

Adicionalmente, avaliamos os possíveis efeitos da ivabradina sobre o peso corporal dos diferentes grupos. A partir dos resultados, foi possível observar que não houve alteração do peso corporal nos animais controles e desnutridos tratados com ivabradina em relação aos animais submetidos a injeção com PBS. Esses dados apontam que a ivabradina não apresenta efeito sobre o metabolismo energético dos animais. Nossos dados concordam com os resultados

obtidos por Gent e colaboradores (2015) em um estudo sobre longevidade realizado com camundongos, no qual o peso corporal dos animais placebo não apresentou diferença significativa do peso dos animais tratados com ivabradina (Gent *et al.*, 2015).

Ademais, já está bem estabelecido por nosso grupo de pesquisa que a restrição proteica pós-desmame promove aumento da FC de repouso em animais desnutridos, conforme também foi observado no presente estudo (Martins *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Tais resultados corroboram a estudos experimentais realizados em ratos, no qual evidenciaram aumento da FC de repouso em situações de restrição proteica (Oliveira *et al.*, 2004; Gomide *et al.*, 2013).

Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato de que, na desnutrição, pode haver modificações na expressão de proteínas relacionadas à condução do impulso elétrico, como estruturas importantes para a formação do potencial de ação (Denac *et al.*, 2000). A desnutrição proporciona a diminuição dos processos dendríticos e do número de espinhas dendríticas, bem como, diminui a proporção de sinapse/neurônio (Diaz-Cintra *et al.*, 1990; Morgane *et al.*, 2002a; Cordero *et al.*, 2003; Penido *et al.*, 2012), reduz a mielinização e a espessura de segmentos intermodais (Reddy *et al.*, 1979. ; Quirk *et al.*, 1995; Cordero *et al.*, 2003), diminui a liberação e atividade de glutamato (Rotta *et al.*, 2003; Penido *et al.*, 2012) e outras alterações na morfofisiologia de áreas encefálicas que estão associadas a regulação cardiovascular (Plagemann *et al.*, 2000; Pinos *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2011.; Rodrigues-Barbosa *et al.*, 2012).

Interessantemente, estudos tem mostrado um aumento da If no nodo sinoatrial de coelhos, devido à superexpressão de canais HCN, em situações patológicas, promovendo aumento da FC. Neste contexto, optamos por avaliar o efeito do tratamento com ivabradina na diminuição da frequência cardíaca em animais desnutridos. A partir dos resultados foi possível observar que, após o tratamento, os animais do GD-IVA e GC-IVA apresentaram uma redução significativa da frequência cardíaca de repouso em comparação aos animais do GD-PBS e GC-PBS, respectivamente. Contudo, observamos que a queda da FC foi mais acentuada nos animais desnutridos. Tal fato pode ser explicado pela possível ação farmacológica da ivabradina sobre o bloqueio dos canais HCN no nodo sinoatrial, no qual o presente fármaco exerce uma ação uso-dependente, ou seja, a ivabradina se liga aos canais HCN quando estes apresentam-se em sua configuração aberta, promovendo uma maior resposta em situações em que há maior frequência cardíaca.

Tais resultados corroboram a outros estudos no qual mostraram que a ivabradina apresentou ação sobre a redução da FC em situações como infarto do miocárdio e IC (Mulder

et al., 2004). Corroborando tais achados, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, em ratos adultos saudáveis, também observou diminuição significativa da FC de repouso nos animais tratados com ivabradina (IVA: 2mg/kg/dia i.p.) em relação ao grupo veículo (Silva *et al.*, 2016).

Em um estudo sobre choque séptico em ratos, foi mostrado que a ivabradina (administrada de forma oral) diminuiu a FC de repouso sem apresentar qualquer impacto na pressão sanguínea, sugerindo não provocar alterações hemodinâmicas (Wei *et al.*, 2016). O mesmo foi encontrado por Erdem e colaboradores, em um estudo com pacientes ambulatoriais apresentando insuficiência cardíaca, no qual apontou que a realização do tratamento a longo prazo com ivabradina diminuiu a FC de repouso (Erdem *et al.*, 2017).

Sabe-se que o sistema nervoso também é afetado pela desnutrição, uma vez que a restrição proteica presente no início da vida está relacionada a modificações neuro-anatômicas, neuro-químicas e comportamentais (Almeida *et al.*, 1996). Neste contexto, optamos por realizar o bloqueio autonômico cardíaco por meio da ação farmacológica de Metoprolol e Metil-atropina, sendo tal metodologia também utilizada em outros modelos experimentais (Diz e Jacobowitz, 1984; Ahmed *et al.*, 1994; Convertino e Sather, 2000). A realização do bloqueio do SNS por meio do bloqueador- β 1- adrenérgico, Metoprolol, proporcionou uma redução significativa da FC em animais do GD-PBS, contudo, a realização do bloqueio autonômico não apresentou ação significativa sobre a FC dos animais do GC-PBS, sugerindo que os animais submetidos à dieta hipoproteica apresentam uma elevação da atividade simpática eferente cardíaca. Nossos dados são semelhantes aos encontrados na literatura no qual demonstram elevação da atividade simpática em animais submetidos a distintos protocolos de desnutrição (Phillips e Barker, 1997; Martins *et al.*, 2011). Corroborando nossos achados, um estudo realizado com ratos desnutridos apresentou um aumento significativo do tônus simpático em comparação aos animais controle (Barros *et al.*, 2014).

Tal fato sustenta a hipótese que a desnutrição proteica pós-desmame promove alterações no controle autonômico tônico cardiovascular, bem como, estudos têm mostrado que a desnutrição modifica a regulação da liberação de noradrenalina central, promovendo a elevação da concentração desse neurotransmissor no córtex cerebral (Belmar *et al.*, 1996).

Adicionalmente, após a aplicação do fármaco metil-atropina, o bloqueio dos receptores colinérgicos muscanínicos aumentou a FC dos animais do GC-PBS, mas não apresentou alteração significativa da FC dos animais do GD-PBS. Assim, os dados apontam para um

prejuízo da resposta parassimpática cardíaca nos animais desnutridos. Esses resultados corroboram dados obtidos por nosso grupo de pesquisa, no qual são encontrados dados semelhantes (Martins *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013).

Desse modo, optamos por avaliar a influência da ivabradina sobre a alteração autonômica cardíaca em animais controle e desnutridos. Nossos resultados mostraram que, a ivabradina influenciou a atividade simpática cardíaca, promovendo a redução do efeito simpático para o coração, revertendo, assim, as alterações observadas em animais desnutridos. O mesmo foi observado com relação ao efeito vagal cardíaco, no qual a ivabradina também proporcionou a reversão das alterações observadas na desnutrição, aumentando, assim, o efeito parassimpático que estava reduzido. Até o momento, não há nenhum estudo na literatura que aborde a ação da ivabradina sobre as alterações autonômicas cardíacas em animais desnutridos. Contudo, estes resultados podem ser explicados por um estudo em que mostra a ação da ivabradina sobre a redução dos níveis plasmáticos de noradrenalina após o período de três meses de administração do fármaco, o que indicaria uma redução da atividade simpática (Vaquero *et al.*, 2007).

Diferentemente dos nossos achados, um estudo realizado com pacientes com síndrome de taquicardia postural investigou o efeito da ivabradina sobre o equilíbrio simpato-vagal e não observou ação da ivabradina sobre a atividade simpática, bem como, sobre a atividade vagal, apesar da redução significativa da FC. Tais resultados podem ser explicados pela dosagem de ivabradina administrada aos pacientes, uma vez que, no estudo em questão foi realizada a dosagem oral única aguda antes da realização dos experimentos (Barzilai e Jacob, 2015). O mesmo foi observado por Joannides e colaboradores no qual relataram que a administração aguda de ivabradina não apresentou efeito sobre a atividade do sistema nervoso autônomo em indivíduos saudáveis (Joannides *et al.*, 2006).

Nosso grupo de pesquisa também avaliou a ação da ivabradina sobre o controle autonômico tônico, entretanto não foi observada nenhuma atuação do fármaco em relação aos animais controle. Contudo, tal fato pode ser explicado pelo estado de saúde prévio dos grupos experimentais, uma vez que o estudo se tratava da ação da ivabradina em animais adultos e saudáveis (Silva *et al.*, 2016). Os resultados do presente estudo corroboram dados obtidos por Nerla e colaboradores, uma vez que, tais autores relataram um aumento modesto do tônus cardiovascular vagal induzido por ivabradina em pacientes com síncope, apesar do melhor resultado observado ao utilizar outros tratamentos (Nerla *et al.*, 2012). Contudo, nenhum trabalho até o momento encontrou resultados semelhantes aos observados em nosso estudo, no

qual a ivabradina reverte as alterações do SNA encontradas na desnutrição. Logo, como não há relação direta entre os canais HCNs e controle autonômico, sugere-se que a ivabradina reverte as alterações autonômicas por meio de seus efeitos pleiotrópicos, uma vez que, estudos têm mostrado que o fármaco apresenta impactos positivos sobre o estresse oxidativo, inflamação, fibrose e hipertrofia ventricular esquerda (Becher *et al.*, 2012).

Adicionalmente, avaliamos a FCi obtida a partir da realização do duplo bloqueio autonômico, após a aplicação do segundo fármaco (metil-atropina ou Metoprolol). Desse modo, a partir dos resultados foi possível observar que não houve diferença significativa na FCi entre o GC-PBS e GD-PBS, sugerindo que não há alteração da FCi na desnutrição. Contudo, após o tratamento com ivabradina foi observada uma diminuição significativa da FCi em ambos os grupos, GC-IVA e GD-IVA. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a ivabradina atua bloqueando os canais HCN que contribuem de forma importante para a despolarização diastólica lenta no nodo sinoatrial, promovendo uma redução fisiológica da FCi em ambos os grupos, controle e desnutrido. Silva e colaboradores (Silva *et al.*, 2016) também mostraram que a ivabradina reduz a FCi em animais saudáveis, corroborando os nossos achados.

No intuito de avaliar o controle autonômico para o coração, calculamos o ISV. O índice foi proposto por Golberger (1999) e é definido pela média da FC de repouso sobre a média da FCi. A partir do cálculo, os dados obtidos são classificados em: predomínio simpático cardíaco, quando os valores se apresentam maiores que 1 e predominância cardíaca vagal, quando os valores são inferiores a 1 (Goldberger, 1999). Como esperado, os animais do GD-PBS apresentaram ISV maior que 1, mostrando predominância simpática para o coração, enquanto os animais do GC-PBS apresentaram predominância vagal. Sabe-se que no desequilíbrio autonômico cardíaco há maior risco de morte súbita (Judy *et al.*, 1976; Fletcher, 2001; Schultz *et al.*, 2007), portanto, o tratamento com ivabradina mostrou-se de extrema importância, uma vez que, foi possível observar uma diminuição significativa do ISV em animais do GD-IVA em comparação aos animais do GD-PBS, mostrando assim que a ivabradina contribuiu para a redução da predominância simpática cardíaca observada em animais desnutridos.

Sugere-se que o efeito da ivabradina sobre o controle autonômico poder ser uma explicação para redução da FC de repouso observada em animais desnutridos. Tal evento pode ser pautado na ação da atividade simpática e da atividade vagal sobre os canais HCN, uma vez que, o SNA influencia a concentração intracelular de AMPc, que modula a abertura dos canais HCN, aumentando o fluxo da corrente funny e conseqüentemente, a FC. Assim, a melhora do controle autonômico cardíaco pode promover uma redução da FC em animais desnutridos.

Outro fato importante é o mecanismo de ação da ivabradina. O bloqueio dos canais HCN é favorecido pela despolarização, quando o fármaco atinge seu sítio de ligação intracelular, uma vez que, a ivabradina liga-se aos canais HCN em estado aberto, cuja configuração depende de AMPc. Conseqüentemente, a ivabradina apresenta uma maior atividade quando os níveis de AMPc estão aumentados, como pode ser observado na estimulação adrenérgica, o que explica a maior ação da ivabradina nos animais desnutridos. Portanto, acredita-se que este fármaco atua na redução da FC de repouso dos animais desnutridos por meio do bloqueio dos canais HCN, bem como, por sua ação sobre a melhoria do controle autonômico cardiovascular nestes animais.

A restrição proteica pós-natal promove importantes disfunções cardíacas, promovendo o desenvolvimento do remodelamento cardíaco. Dentre as morbidades relacionadas às doenças cardiovasculares, destaca-se a hipertrofia cardíaca, que está fortemente associada ao risco de morte súbita e evolução para insuficiência cardíaca (Grossman *et al.*, 1975; Lorell e Carabello, 2000). Desse modo, também objetivamos avaliar os possíveis efeitos da ivabradina sobre o remodelamento cardíaco em animais desnutridos. No presente estudo observamos um aumento do peso relativo do ventrículo esquerdo em animais do GD-PBS em relação ao GC-PBS. Esses resultados corroboram dados da literatura onde apontam que o baixo teor proteico da dieta após o desmame prejudica drasticamente o ganho de peso, acarretando redução do peso corporal. Contudo, estudos tem mostrado um aumento no peso do ventrículo esquerdo em relação ao peso corporal dos animais (Penitente *et al.*, 2013). Penitente e col. mostraram que a restrição de proteína induz uma reorganização morfofuncional do miocárdio, que coexiste com disfunção biomecânica dos cardiomiócitos em ratos. Neste estudo, as evidências iniciais indicam que a insuficiência contráctil foi provavelmente associada a alterações patológicas da cinética do cálcio intracelular (Penitente *et al.*, 2013). Diferentes modelos de desnutrição, tais como restrição de proteína ou restrição de caloria também mostraram deprimir a função ventricular esquerda (Okoshi *et al.*, 2002; Gut *et al.*, 2003; Pinotti *et al.*, 2010).

Essa alteração cardíaca pode ser explicada por estudos em a restrição alimentar promove um aumento do conteúdo de colágeno no miocárdio, prejudicando o período de contração, que poderiam estar relacionados a alterações no transporte intracelular de cálcio e do sistema beta-adrenérgico observado na fisiopatologia da desnutrição, promovendo disfunção sistólica ventricular (Cicogna *et al.*, 2001; Gut *et al.*, 2003; Okoshi *et al.*, 2004). Contudo, ao avaliarmos o peso relativo do ventrículo esquerdo em animais desnutridos tratados com ivabradina observamos que as alterações ventriculares provocadas pela desnutrição apresentaram uma

melhora significativa em relação aos animais do GD-PBS, mostrando que a ivabradina apresenta um efeito positivo sobre o remodelamento cardíaco. Essa ação da ivabradina ainda não está bem estabelecida, contudo, sugere-se que sua ação acontece devido a modificação dos parâmetros fisiológicos promovidos pelo fármaco, promovendo redução da frequência cardíaca, bem como, reparação das alterações autonômicas na desnutrição. Adicionalmente, estudos tem mostrado que a ivabradina promove diminuição da densidade de colágeno, modificando o peso do ventrículo, apresentando impactos positivo sobre o remodelamento do VE (Becher *et al.*, 2012).

Até o momento, poucos estudos investigaram a ação da ivabradina sobre o sistema de controle autonômico cardíaco, sobretudo, sobre sua ação em situações de desequilíbrio autonômico. Desse modo, os resultados obtidos por este estudo apresentam uma nova perspectiva sobre os mecanismos de ação deste fármaco sobre tais parâmetros, uma vez que, a alteração autonômica na desnutrição promove importantes efeitos sistêmicos.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo avaliamos o efeito do tratamento crônico com ivabradina, um fármaco inibidor dos canais HCN, no controle autonômico tônico da FC. Nossos resultados mostraram que, em animais desnutridos, a administração da ivabradina a longo prazo melhorou a regulação autonômica da FC (i.e. reparou o efeito simpático, o efeito vagal cardíaco e a FC de repouso, bem como, melhorou o índice simpato-vagal) e o remodelamento ventricular esquerdo. Desse modo, nossos dados fornecem novas percepções sobre os efeitos crônicos da ivabradina em situações patológicas (i.e. desnutrição) que comprometem o controle autonômico cardíaco.

8. REFERÊNCIAS

ACCILI, E. A. et al. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. **News Physiol Sci**, v. 17, p. 32-7, Feb 2002. ISSN 0886-1714 (Print)

0886-1714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821534> >.

ACCILI, E. A.; ROBINSON, R. B.; DIFRANCESCO, D. Properties and modulation of If in newborn versus adult cardiac SA node. . **Am J Physiol** , v. 272, p. 1549-52, 1997.

AGARWAL, K. N.; PRASAD, C.; TANEJA, V. Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. **Ann Nutr Metab**, v. 25, n. 4, p. 228-33, 1981. ISSN 0250-6807 (Print)

0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7305287> >.

AHMED, M. W. et al. Effect of physiologic and pharmacologic adrenergic stimulation on heart rate variability. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 4, p. 1082-90, Oct 1994. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7930202> >.

ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.; GALLER, J. R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 20, p. 389-402, 1996.

ANTWI, S. Malnutrition: missed opportunities for diagnosis. **Ghana Med J**, v. 42, n. 3, p. 101-4, Sep 2008. ISSN 0016-9560 (Print)

0016-9560 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274107> >.

AZEVEDO, P. S. et al. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arq Bras Cardiol** , 2015.

BARRETO, G. S. C. et al. Impact of malnutrition on cardiac autonomic modulation in children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 92(6), p. 638-644, 2016.

BARROS, M. A. V. et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 25(1), p. 123-30, 2014.

BARUSCOTTI, M.; BUCCHI, A.; DIFRANCESCO, D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. **Pharmacol Ther**, v. 107, n. 1, p. 59-79, Jul 2005. ISSN 0163-7258 (Print)

0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963351> >.

BARUSCOTTI, M.; DIFRANCESCO, D. Pacemaker channels. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1015, p. 111-21, May 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201153> >.

BARZILAI, M.; JACOB, G. The Effect of Ivabradine on the Heart Rate and Sympathovagal Balance in Postural Tachycardia Syndrome Patients. **Rambam Maimonides Med J**, v. 6, n. 3, Jul 30 2015. ISSN 2076-9172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26241226> >.

BECHER, P. M. et al. Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and β -receptor blockade. . **Hypertension.**, v. 59, p. 949–957, 2012.

BELL, J. M.; SLOTKIN, T. A. Postnatal nutritional status influences development of cardiac adrenergic receptor binding sites. **Brain Res Bull**, v. 21, n. 6, p. 893-6, Dec 1988. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3224282> >.

BELMAR, J. et al. Malnutrition early in life impairs alpha-2 adrenoreceptor regulation of noradrenaline release in the rat cerebral cortex. . **Nutrition Research**, v. 16, n. 10, p. 1727-1734, 1996.

BENABE, J. E. et al. Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding. **Am J Physiol**, v. 265, n. 5 Pt 2, p. F660-9, Nov 1993. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238546> >.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243-60, Jan 19 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207566> >.

BOIS, P. et al. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 4, p. 1051-7, Jun 1996. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8799581> >.

BONATTO, F. et al. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. **Brain Res**, v. 1042, n. 1, p. 17-22, Apr 25 2005. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823248> >.

BORER, J. Drug insight: If inhibitors as specific heart-rate-reducing agents. . **Nature Clin Pract Cardiovasc Med.** , v. 1, p. 103-9, 2004.

BROWN, H.; DIFRANCESCO, D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sinoatrial node. . **J. Physiol.** , v. 308:, p. 331–351, 1980. .

BROWN, H. F.; DIFRANCESCO, D.; NOBLE, S. J. How does adrenaline accelerate the heart? . **Nature.** , v. 280, p. 235–236., 1979.

BROZENA, S. C.; JESSUP, M. The new staging system for heart failure. What every primary care physician should know. . **Geriatrics 2003;**, v. 58(6), p. 31–6., 2003.

BUCCHI, A.; BARUSCOTTI, M.; DIFRANCESCO, D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. **J Gen Physiol**, v. 120, n. 1, p. 1-13, Jul 2002. ISSN 0022-1295 (Print)

0022-1295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084770> >.

CERBAI, E. et al. Characterization of the hyperpolarization-activated current, If, in ventricular myocytes from human failing heart. . **Circulation research**, v. 95, p. 568–571, 1997.

CICOGNA, A. C. et al. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. **Nutrition Research** v. 21, p. 639-648., 2001.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. . **Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol.** , v. 35(3), p. 569-82, 2000.

COHN, J. N. et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. . **N Engl J Med**, v. 31, p. 819–823., 1984.

CONVERTINO, V. A.; SATHER, T. M. Effects of cholinergic and betaadrenergic blockade on orthostatic tolerance in healthy subjects. . **Clin.Auton.Res.** , v. 10, p. 327-336, 2000.

CORDERO, M. E. et al. Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of the neocortex in two groups of early postnatal undernourished-rehabilitated rats. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 142, n. 1, p. 37-45, Apr 14 2003. ISSN 0165-3806 (Print)

0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694943> >.

D'SOUZA, A. et al. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. **Nat Commun**, v. 5, p. 3775, May 13 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825544> >.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171117> >.

DENAC, H.; MEVISSSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 362, n. 6, p. 453-79, Dec 2000. ISSN 0028-1298 (Print)

0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11138838> >.

DIAZ-CINTRA, S. et al. Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. **J Comp Neurol**, v. 292, n. 1, p. 117-26, Feb 01 1990. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2107216> >.

DIFRANCESCO, D. Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. **Nature**, v. 324, n. 6096, p. 470-3, Dec 4-10 1986. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2431323> >.

_____. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. **Annu Rev Physiol**, v. 55, p. 455-72, 1993. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682045> >.

_____. Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. **J Physiol**, v. 515 (Pt 2), p. 367-76, Mar 01 1999. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10050004> >.

_____. Cardiac pacemaker I(f) current and its inhibition by heart rate-reducing agents. **Curr Med Res Opin**, v. 21, n. 7, p. 1115-22, Jul 2005. ISSN 0300-7995 (Print)

0300-7995 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16004681> >.

DIFRANCESCO, D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. . **Pharmacol Res.** , v. 53, p. 399-406, 2006.

DIFRANCESCO, D.; CAMM, J. A. Heart Rate Lowering by Specific and Selective If Current Inhibition with Ivabradine. **Drugs**, v. 64, p. 1757-65, 2004.

DIFRANCESCO, D.; MANGONI, M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. **J Physiol**, v. 474, n. 3, p. 473-82, Feb 01 1994. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516974> >.

DIFRANCESCO, D.; TORTORA, P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. **Nature**, v. 351, n. 6322, p. 145-7, May 09 1991. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709448> >.

DISTEFANO, G.; SCIACCA, P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. **Ital J Pediatr**, v. 38, p. 41, Sep 12 2012. ISSN 1824-7288 (Electronic)

1720-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971785> >.

DIZ, D. I.; JACOBOWITZ, D. M. Effects of adrenalectomy, propranolol and methylatropine on the increase in heart rate induced by injection of dermorphin in the rat anterior hypothalamic nucleus. **Brain Res**, v. 293, n. 1, p. 196-9, Feb 13 1984. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6704719> >.

ERDEM, F. H. et al. The Effects of Ivabradine on Left Ventricular Synchronization and Tei Index in Patients with Systolic Heart Failure. **Acta Cardiol Sin**, v. 33, n. 1, p. 58-65, Jan 2017. ISSN 1011-6842 (Print)

1011-6842 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115808> >.

FERGUSON, A. V.; BAINS, J. S. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 24, n. 1, p. 96-101, Jan 1997. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043813> >.

FERNÁNDEZ-VELASCO, M. et al. Regional distribution of hyperpolarization-activated current (I_f) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. . **J Physiol** v. 553, p. 395–405, 2003.

FLETCHER, E. C. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. **J Appl Physiol (1985)**, v. 90, n. 4, p. 1600-5, Apr 2001. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247966> >.

FORTES, L. H. S. **Efeito Da Ovariectomia Sobre O Balanço Autonômico Cardíaco De Ratas Submetidas À Desnutrição Proteica** 2010. 119 (Mestrado). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

FORTES, L. H. S. Efeito Da Ovariectomia Sobre O Balanço Autonômico Cardíaco De Ratas Submetidas À Desnutrição Proteica **Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.**, 2010.

GENT, S. et al. Heart rate reduction and longevity in mice. **Basic Res Cardiol**, v. 110, n. 2, p. 2, Mar 2015. ISSN 1435-1803 (Electronic)

0300-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589054> >.

GIACOMELLI, F. R. B.; MARÇAL-NATALI, M. R. A utilização de ratos em modelos experimentais de carência nutricionais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, 1999.

GOLDBERGER, J. J. Sympathovagal balance: how should we measure it? . **Am.J Physiol** v. 276, p. 1273-1280 1999.

GOMIDE, J. M. et al. Increased activity of the reninangiotensin and sympathetic nervous systems is required for regulation of the blood pressure in rats fed a low-protein diet. **Exp. Physiol.** , v. 98, p. 57–66, 2013.

GOMIDE, J. M. C. Participação dos receptores AT1 de Angiotensina II no controle da Pressão Arterial de ratos submetidos a desnutrição proteica. **Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.**, 2007.

GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 103, n. 1, p. 21-35, Oct 20 1997. ISSN 0165-3806 (Print)

0165-3806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9370057> >.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. **J Clin Invest**, v. 56, n. 1, p. 56-64, Jul 1975. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/124746> >.

GUT, A. L. et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and betaadrenergic system changes. . **Nutrition Research** v. 23, p. 911-919, 2003.

HEIKENS, G. T. et al. Case management of HIV-infected severely malnourished children: challenges in the area of highest prevalence. **Lancet**, v. 371, n. 9620, p. 1305-7, Apr 12 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406865> >.

HEIMBURGER, D. C. **Desnutrição e avaliação nutricional.** Harrison Medicina Interna. FAUCI, A. S. K., D.L.; LONGO, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. Rio de Janeiro. 17 2009.

HERRMANN, S.; LAYH, B.; LUDWIG, A. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: An expression study in the mouse heart. . **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 51, p. 997–1006, 2011.

ISHII, T. M. et al. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. **J Biol Chem**, v. 274, n. 18, p. 12835-9, Apr 30 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212270> >.

JOANNIDES, R. et al. Comparative effects of ivabradine, a selective heart rate-lowering agent, and propranolol on systemic and cardiac haemodynamics at rest and during exercise. . **Br J Clin Pharm.** , v. 61, p. 127-37, 2006.

JOSHI, S. et al. Maternal Protein Restriction Before Pregnancy Affects Vital Organs of Offspring in Wistar Rats. **Metabolism**, v. 51 (1), p. 13-18, 2003.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, Jun 1976. ISSN 0009-7330 (Print)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/178466> >.

KAWAGUCHI, Y.; HAMA, K. Physiological Heterogeneity of non-pyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. **Exp Brain Res**, v. 72(3), p. 494-02, 1988.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Prinípios de Bioquímica.** . Sarvier, 2005.

LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. Malnutrition and Brain: Chan in concepts, Chan in concerns. **j. Nutr**, v. 125, p. 2212-2220, 1995.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 470-9, Jul 25 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908222> >.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J Nutr**, v. 128, n. 2 Suppl, p. 401S-406S, Feb 1998. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478036> >.

LUDWIG, A. et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 587-91, Jun 11 1998. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634236> >.

LUDWIG, A. et al. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. **EMBO J**, v. 18, n. 9, p. 2323-9, May 04 1999. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228147> >.

MACHADO, B. H. et al. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 533-543, 1997.

MACKIEWICZ, U. et al. Ivabradine Protects Against Ventricular Arrhythmias in Acute Myocardial Infarction in the Rat **J. Cell. Physiol.**, v. 229, n. 813-823,, 2014.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F. Methods for assessment of sympatho-vagal balance: power spectral analysis. . Levy, M.N., Schwartz, P.J. (Eds.), **Vagal Control of the Heart: Experimental Basis and Clinical Implications**. Futura, Armonk, NY, , p. 433-454., 1994.

MARIONNEAU, C. et al. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. **Circ Res**, v. 102, n. 11, p. 1406-15, Jun 06 2008. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451341> >.

MARTINEZ-MALDONADO, M. et al. Renal renin, angiotensinogen, and ANG I-converting-enzyme gene expression: influence of dietary protein. **Am J Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 2, p. F981-8, Jun 1993. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391753> >.

MARTINS, C. D.; CHIANCA, D. A.; FERNANDES, L. G. Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. . **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 38, p. 89-93, 2011.

MARTINS, C. D. D. Avaliação do balanço autonômico cardíaco de ratos submetidos a uma dieta hipoprotéica. **Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto**, 2007.

MATOS, R. J. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience** v. 196, p. 16-24, 2011.

MENDOZA, A.; LAZARTIGUES, E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 9, n. 4, p. 201-8, Aug 2015. ISSN 1753-9455 (Electronic)

1753-9447 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801471> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar**. SAÚDE, D. D. A. A. Brasil: 144 p. 2005.

MONFREDI, O. et al. The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 33, n. 11, p. 1392-406, Nov 2010. ISSN 1540-8159 (Electronic)

0147-8389 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946278> >.

MONNET, X. et al. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 299, n. 3, p. 1133-9, Dec 2001. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714904> >.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002a. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204193> >.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. L.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26(4), p. 471-83, 2002b.

MULDER, P. et al. Long-term heart rate reduction induced by the selective If current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. . **Circulation**, v. 109, p. 1674-9, 2004.

NATTEL, S. et al. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 425-56, Apr 2007. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429037> >.

NERLA, R. et al. Differential effects of heart rate reduction by atenolol or ivabradine on peripheral endothelial function in type 2 diabetic patients. **Heart**, v. 98, n. 24, p. 1812-6, Dec 2012. ISSN 1468-201X (Electronic)

1355-6037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086971> >.

OKOSHI, K. et al. Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of in vivo and in vitro studies. . **Nutrition Research** v. 22, p. 1353-1364, 2002.

OKOSHI, K. et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. **Jpn Heart J**, v. 45, n. 4, p. 647-56, Jul 2004. ISSN 0021-4868 (Print)

0021-4868 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353875> >.

OKOSHI, M. P. et al. Myocardial remodeling and dysfunction are induced by chronic food restriction in spontaneously hypertensive rats. **Nutrition Research** v. 26, p. 567-572, 2006.

OLIVEIRA, E. L. et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. **Nutr Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 201-5, Aug 2004. ISSN 1028-415X (Print)

1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682646> >.

PAPE, H. C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 58, p. 299-327, 1996. ISSN 0066-4278 (Print)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8815797> >.

PEDROSA, M. L.; MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 3-4, p. 331-8, 1987. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3132211> >.

PENIDO, A. B. et al. Malnutrition during central nervous system growth and development impairs permanently the subcortical auditory pathway. **Nutr Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 31-6, Jan 2012. ISSN 1476-8305 (Electronic)

1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305651> >.

PENITENTE, A. R. et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sci**, v. 81, n. 7, p. 609-14, Jul 26 2007. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17688888> >.

PENITENTE, A. R. et al. Protein Restriction after Weaning Modifies the Calcium Kinetics and Induces Cardiomyocyte Contractile Dysfunction in Rat. **Cells Tissues Organs** v. 198, p. 311-317 2013.

PHILLIPS, D. I.; BARKER, D. J. Association between low birthweight and high resting pulse in adult life: is the sympathetic nervous system involved in programming the insulin resistance syndrome? **Diabet Med**, v. 14(8), p. 673-7, 1997.

PINOS, H. et al. Effects of undernourishment on the hypothalamic orexinergic system. **Physiol. Behav.**, v. 102, p. 17-21, 2011.

PINOTTI, M. F. et al. A comparative study of myocardial function and morphology during fasting/refeeding and food restriction in rats. **Cardiovasc Pathol**, v. 19, n. 5, p. e175-82, Sep-Oct 2010. ISSN 1879-1336 (Electronic)

1054-8807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914094> >.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. . **J. Nutr.** , v. 130, p. 2582–2589., 2000.

QUIRK, G. J. et al. Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract. **Brain Res**, v. 670, n. 2, p. 277-82, Jan 30 1995. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743191> >.

RAGUENEAU, I. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the effects of ivabradine, a direct sinus node inhibitor, on heart rate in healthy volunteers. **Clin Pharmacol Ther**, v. 64, n. 2, p. 192-203, Aug 1998. ISSN 0009-9236 (Print)

0009-9236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728900> >.

REDDY, P. V.; DAS, A.; SASTRY, P. S. Quantitative and compositional changes in myelin of undernourished and protein malnourished rat brains. . **Brain Res.**, v. 161, p. 227–235, 1979. .

RICARDO, M.; LEÃES, P. E. Remodelamento Ventricular : dos Mecanismos Moleculares e Celulares

ao Tratamento. . **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, p. 1–7, 2004.

RICCIONI, G. Ivabradine: recent and potential applications in clinical practice. **Expert Opin Pharmacother**, v. 12, n. 3, p. 443-50, Feb 2011. ISSN 1744-7666 (Electronic)

1465-6566 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254949> >.

RODRIGUES-BARBOSA, M. C. et al. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. **Brain Res**, v. 1483, p. 20-30, Nov 05 2012. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22917584> >.

RODRIGUES, F. A. Reposta pressora à microinjeção de L-glutamato no bulbo rostroventrolateral de ratos submetidos à desnutrição protéica. **Dissertação de Mestrado - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.**, 2008.

ROTTA, L. N. et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochem Res**, v. 28, n. 8, p. 1181-6, Aug 2003. ISSN 0364-3190 (Print)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834257> >.

SANTORO, B. et al. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. . **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** , v. 94, p. 14815–14820, 1997.

SANTORO, B. et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. . **Cell.** , v. 93: , p. 717–729. , 1998.

SANTORO, B.; TIBBS, G. R. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. **Ann N Y Acad Sci**, v. 868, p. 741-64, Apr 30 1999. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414361> >.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L.; DING, Y. Arterial chemoreceptors and sympathetic nerve activity: implications for hypertension and heart failure. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 6-13, Jul 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502495> >.

SCICCHITANO, P. et al. HCN channels and heart rate. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4225-35, Apr 05 2012. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481543> >.

SEIFERT, R. et al. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 16, p. 9391-6, Aug 03 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430953> >.

SHEPHERD, J. T.; MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** , v. 105, 1–99, 1986.

SHI, W. et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. **Circ Res**, v. 85, n. 1, p. e1-6, Jul 09 1999. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400919> >.

SHIN, K. S.; ROTHBERG, B. S.; YELLEN, G. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. **J Gen Physiol**, v. 117, n. 2, p. 91-101, Feb 2001. ISSN 0022-1295 (Print)

0022-1295 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158163> >.

SILVA, F. C. et al. Chronic Treatment with Ivabradine Does Not Affect Cardiovascular Autonomic Control in Rats. **Front Physiol.**, v. 7, p. 305, 2016.

SILVA, F. C. S. et al. Malnutrition alters the cardiovascular responses induced by central injection of tityustoxin in Fischer rats. **Elsevier**, 2013.

SILVA, F. C. S.; MENEZES, R. C.; CHIANCA, D. A. The implication of protein malnutrition on cardiovascular control systems in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 246, 2015.

SPINALE, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1285-342, Oct 2007. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928585> >.

STILLITANO, F. et al. Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 45, p. 289-299, 2008.

SUTTON, M. G. S. J.; SHARPE, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. **Circulation research** v. 101(25), p. 2981-2988, 2000.

SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 215-62, Jan 1999. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922372> >.

THAYER, J. F.; LANE, R. D. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. **Biol Psychol**, v. 74, n. 2, p. 224-42, Feb 2007. ISSN 0301-0511 (Print)

0301-0511 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182165> >.

THOLLON, C. et al. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea pig-cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. **Br J Pharmacol.** , v. 112, p. 37-42 1994.

TONKISS, J. et al. Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. **Hypertension**, v. v. 32, p. p. 108-14, 1998.

TROPIA, F. C. et al. Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. **Nutr Neurosci**, v. 4, n. 2, p. 99-107, 2001. ISSN 1028-415X (Print)

1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842885> >.

VAQUERO, M. et al. Ivabradina, un bloqueador selectivo de la corriente If. Aspectos farmacológicos y tolerabilidad. **Rev Esp Cardiol Supl.** , v. 7, p. 32D-45D, 2007.

WEI, C. et al. If Channel Inhibition With Ivabradine Does Not Improve Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock. **Shock**, v. 46(3), p. 297-303, 2016.

WHITNEY, E.; ROLFES, S. R. **Understanding Nutrition**. 10^a edition 2007.

WINICK, M. Nutrition and nerve cell growth. **Fed Proc**, v. 29, n. 4, p. 1510-5, Jul-Aug 1970. ISSN 0014-9446 (Print)

0014-9446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5459899> >.

YANAGIHARA, K.; IRISAWA, H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. **Pflugers Arch**, v. 385, n. 1, p. 11-9, May 1980. ISSN 0031-6768 (Print)

0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7191093> >.

YANIV, Y. et al. The “Funny” Current (If) Inhibition by Ivabradine at Membrane Potentials Encompassing Spontaneous Depolarization in Pacemaker Cells. **Molecules**, v. 17, p. 8241–8254, 2015.

YASUI, K. et al. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. **Circ Res**, v. 88, n. 5, p. 536-42, Mar 16 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11249878> >.

YU, H.; CHANG, F.; COHEN, I. S. Pacemaker current exists in ventricular myocytes. **Circ Res**, v. 72, n. 1, p. 232-6, Jan 1993. ISSN 0009-7330 (Print)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678078> >.