



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**MECANISMOS NEURAIS ENVOLVIDOS NO RETARDO DO
ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE LÍQUIDOS EM RATOS
INDUZIDO ATRAVES DO INFARTO RECENTE DO
MIOCARDIO**

Wilson Ranú Ramirez Nunez

Tese de Doutorado apresentado à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, Área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação do Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R145m Ramírez Nunez, Wilson Ranú, 1973 -
Mecanismos neurais envolvidos no retardo do
esvaziamento gástrico de líquidos em ratos induzido
através do infarto recente do miocárdio / Wilson Ranú
Ramírez Nunez. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Eros Antonio de Almeida.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esvaziamento gástrico. 2. Infarto do miocárdio.
3. Núcleo hipotalâmico paraventricular. 4. Receptores de
GABA-B. 5. Receptores adrenergicos. I. Almeida, Eros
Antonio de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Neural mechanisms involved in delayed gastric emptying of liquids induced through recent myocardial infarction in rats.

Palavras-chave em inglês:

Gastric emptying

Myocardial infarction

Receptors, adrenergic

Paraventricular hypothalamic nucleus

Receptors, GABA-B

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Eros Antonio de Almeida [Orientador]

Maria Aparecida Barone Teixeira

Sérgio Alberto Rupp Paiva

Maria Aparecida Mesquita

José Francisco Figueiredo

Data da defesa: 24-05-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Wilson Ranú Ramirez Nunez

Orientador: Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira

2. Prof. Dr. Sérgio Alberto Rupp Paiva

3. Profa. Dra. Maria Aparecida Mesquita

4. Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

5. Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/05/2012

DEDICATÓRIA

“Ao único e verdadeiro amor da minha vida...”

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e por me conceder mais do que mereço.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida por acreditar em mim e me permitir desenvolver essa pesquisa sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Edgar Ferro Collares pela paciência, pela ajuda na pesquisa, e pelo exemplo de pesquisador.

À Michiko Regina Ozaki, por me levantar todas as vezes que ameacei em cair, não foi um caminho muito fácil chegar até aqui, e você foi um suporte.

À Adriana Mendes Vinagre, pela ajuda na pesquisa e por todos esses anos de amizade.

A todos os funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, que de uma ou outra forma sempre me ajudaram facilitando essa pesquisa.

Aos meus pais Wilson e Ofi, meus irmãos Marco e Patricia, Leo, tia Teresa, sobrinhos Patrick, Temi e Ricardo por serem meu porto seguro.

Aos meus amigos Mayo, Junior, Roger e Neto por tudo que representam na minha vida.

Resumo

O esvaziamento gástrico (EG) consiste na transferência ordenada do conteúdo do estômago para o duodeno, Situações patológicas como alterações hemodinâmicas modificam a velocidade do E.G. e função motora do trato gastrointestinal. O infarto do miocárdio determina retarde do E.G. em ratos, possivelmente pelo estresse causado pela ligadura da artéria coronária. O sistema nervoso central (SNC) afeta as funções motora e secretora gastrintestinais, frente a uma situação de estresse existe aumento da retenção gástrica (RG) induzindo o retarde do E.G. O sistema parassimpático pode estar envolvido neste fenômeno. Por outro lado o sistema simpático controla o E.G., interrompendo a motilidade e a secreção, frente a uma situação de estresse como a do infarto do miocárdio o retarde do E.G., pode estar relacionado à atuação desse sistema. O objetivo deste trabalho foi Avaliar complacência gástrica (CG) em ratos submetidos a infarto recente do miocárdio, participação do nervo vago, sistema nervos simpático, efeito da injeção intracerebro-ventricular de GABA_B e efeito da lesão do núcleo paraventricular no retarde do EG observado no infarto recente do miocárdio em ratos. Utilizados ratos Wistar, machos, entre 220 – 300g, adaptados às condições do laboratório, divididos em 3 grupos: grupo INF; grupo SH e grupo NA. Infarto realizado por ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Animais após cirurgia permaneceram em jejum alimentar recebendo água *ad libitum*. Vinte e quatro horas após foi avaliado EG de 1,5 ml/100g de peso do animal de uma refeição de prova (RP) salina marcada com fenol vermelho. EG foi avaliado indiretamente, através da determinação da % de retenção gástrica (RG) da RP, 10 min. após administração orogástrica. Resultados mostraram que para o estudo da complacência gástrica não houve diferença significativa de pressão intragástrica

entre os três grupos, nos três pontos de medida da pressão intragástrica (PIG) e em complementação as CGs não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si. No estudo da Vagotomia subdiafragmática houve diferença significativa das RG (%) entre os subgrupos SH+Sh vs SH+Inf, o subgrupo Vgx+Inf apresentou diferença significativa em relação ao subgrupo SH+Inf e não diferiu do subgrupo Vgx+Sh. Para o estudo do efeito da injeção intra-cerebro-ventricular de GABA_B houve diferença significativa entre os grupos SH+Sal e SH+Bac e Inf+Sal e Inf+Bac. No estudo da Simpatectomia química, grupo Inf+Sal apresentou diferença significativa quando comparados aos ratos SH+Sal, e grupo Inf+Pra com grupo SH+Sal não apresentaram diferenças significativas. O grupo Inf+Pra e Inf+Sal apresentaram diferença significativa e ratos SH+Pra e SH+Sal apresentaram diferença significativa quando comparados, No estudo da lesão do Núcleo paraventricular houve diferença significativa das RG (%) entre os subgrupos SH+Sh vs SH+Inf, os grupos PVN+Inf e SH+Inf apresentaram diferença significativa. Conclusões: 1) infarto recente do miocárdio não induz modificações no tônus gástrico em ratos, 2) Existe participação do nervo vago no retardo do EG causado pelo infarto recente do miocárdio, 3) Retardo EG mostrado pelos ratos infartados tem participação, pelo menos em parte, dos receptores alpha-1 adrenérgicos do sistema nervoso simpático. 4) Existe participação do núcleo paraventricular no retardo do EG induzido pelo infarto recente do miocárdio.

Abstract

Gastric emptying (GE) is the orderly transfer of stomach contents into the duodenum, pathological situations as hemodynamic changes modify GE speed and motor function of the gastrointestinal tract. Myocardial infarction determines GE delayed in rats, possibly due to stress caused by coronary artery ligation. Central nervous system (CNS) affects gastrointestinal secretory and motor functions, in a stressful situation there is increased gastric retention (GR) inducing GE delay. Parasympathetic system may be involved in this phenomenon. On the other hand sympathetic nervous system controls GE, disrupting motility and secretion, compared to a stressful situation such as myocardial infarction, GE delay, may be related to performance of this system. The objective of this study was to evaluate gastric compliance (GC) in rats submitted to recent myocardial infarction, involvement of vagus nerve, sympathetic nervous system, intra-cerebro-ventricular of GABA_B injectin effect and paraventricular nucleus lesion effect on GE delay observed in recent myocardial infarction in rats. Used male Wistar rats, between 220-300g, adapted to laboratory conditions, divided into three groups: INF, SH and NA groups. Infarction performed by left anterior descending coronary artery ligation. After surgery, animals were fasted receiving water ad libitum. Twenty four hours after was evaluated GE of 1.5ml/100g body weight of a saline test meal (TM) labeled with red phenol. GE was indirectly estimated by determining % of gastric retention (GR) of test meal. 10 min. after orogastric administration. Results showed that gastric compliance study there was no significant difference in intragastric pressure between the three groups, in the three points of measurement of intragastric pressure (IGP) and complementation in GC showed no significant

differences when compared with each other. In subdiaphragmatic vagotomy study, significant difference of GR (%) between subgroups SH+Sh vs SH+Inf, subgroup Vgx+Inf significant difference in the subgroup SH+Inf and did not differ in subgroup Vgx+Sh. To study the effect of intracerebroventricular injection of GABA_B significant difference between groups SH+Sal vs SH+Bac and Inf+Sal vs Inf+Bac. To study the chemical sympatectomy by prazosin, the Inf+Sal group showed significant difference when compared to SH+Sal rats, and the group Inf+Pra with SH+Sal group showed no significant difference. The group Inf+Pra and Inf+Sal showed significant differences and the rats SH+Pra and SH+Sal showed significant difference when compared, for the study of the lesion of paraventricular nucleus of GR significant difference (%) between subgroups SH+Sh vs SH+Inf, the group PVN+Inf and SH+Inf showed significant difference. Conclusions: 1) recent myocardial infarction does not induce changes in gastric tone in rats, 2) there is involvement of the vagus nerve in GE delay caused by recent myocardial infarction, 3) GE delayed in infarcted rats have participation, at least in part, of alpha-1 adrenergic receptors of the sympathetic nervous system, 4) there is participation of the paraventricular nucleus of GE delayed induced by recent myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Traqueotomia e incisão abdominal..	36
Figura 2 – Ligadura do piloro para realizar lavagem do estômago.....	37
Figura 3 – Torneira de três vias.	37
Figura 4 – Bomba de infusão.	38
Figura 5 – Fisiografo.	38
Figura 6 – Monitor de registro.	39
Figura 7 – Incisão na região abdominal.	40
Figura 8 – Secção dos ramos ventral e dorsal do nervo vago.	41
Figura 9 – Estereotáxico.	42
Figura 10 – Perfuração do crânio.	43
Figura 11 – Implantação da sonda de aço.	43

Figura 12 – Capacete de resina acrílica.	44
Figura 13 – Administração endovenosa do Prazosin.	45
Figura 14 – Lesionador eletrônico.	46
Figura 15 – Passagem da corrente.	47
Figura 16 – Estudo da Complacência Gástrica.	56
Figura 17 – Estudo da Vagotomia subdiafragmática.	57
Figura 18 – Estudo do efeito da injeção intracerebro ventricular de GABA _B	58
Figura 19 – Estudo da Simpatectomia química por Prazosin.	59
Figura 20 – Estudo da Lesão do Núcleo paraventricular.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo átrio natriurético
AP	ântero-posterior
BAC	Baclofen
CCK	Colecistocinina
CDV	Complexo dorsal do vago
CG	Complacência gástrica
EG	Esvaziamento Gástrico
GABA_B	Receptor B do ácido gama-aminobutírico
ICV	Intra-cérebro-ventricular
INF	Grupo Infartado
IM	Infarto do Miocárdio
IRM	Infarto recente do miocárdio
IV	Intravenoso
NAIVE	Grupo Naive
NDV	Núcleo dorsal do vago
NPV	Núcleo para-ventricular do hipotálamo
NTS	Núcleo do trato solitário
PVC	Pressão venosa central
PIG	Pressão intragástrica
PRA	Prazosin
PVN	Grupo com lesão do núcleo paraventricular

RG	Retenção Gástrica
RP	Refeição de Prova
SAL	Solução salina
SEM	Erro padrão da média
SH	Grupo Sham
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
TGI	Trato gastrointestinal
VE	Ventrículo Esquerdo
VGX	Grupo Vagotomizado
V	Veículo
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	30
2.2 Objetivo geral.	31
2.3 Objetivos especificos.	31
3. MATERIAL E MÉTODO.....	32
3.1 MATERIAL	33
3.1.1. Animais.	33
3.1.2. Delineamento Experimental.	33
3.1.3. Drogas.	35
3.2 METODOS	36
3.2.1. Medida da Complacência Gástrica	36
3.2.2. Vagotomia Subdiafragmática.	40
3.2.3. Injeção intra-cerebro-ventricular de baclofen.	42
3.2.4. Bloqueio dos receptores alfa 1 – adrenérgicos.	45
3.2.5. Lesão do Núcleo paraventricular.	46
Técnica do infarto do miocárdio.	48
Técnica da determinação do esvaziamento gástrico de líquidos.	49
Técnica da determinação da área de infarto do miocárdio.	51
Análise estatística.	54

4. RESULTADOS.....	55
Estudo da medida da complacência gástrica.	56
Estudo da vagotomia.	57
Estudo do efeito da injeção intra-cerebro-ventricular de baclofen.	58
Estudo do efeito do prazosin.	59
Estudo da lesão do núcleo paraventricular.	60
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. APÊNDICE.	83
9. ANEXOS.	89

1. INTRODUÇÃO

A motricidade do estômago, piloro e duodeno é uma atividade complexa, com movimentos coordenados para que os alimentos sejam transferidos adequadamente para o intestino delgado. Os transtornos da motilidade dentro da parte proximal do tubo digestivo podem desencadear sintomas como náuseas, dor epigástrica, saciedade precoce e anorexia. Tanto a exploração do esvaziamento gástrico, como da motilidade gástrica e duodenal, propriamente ditas, podem ser necessárias para se fazer um diagnóstico correto e elaborar estratégia terapêutica eficaz, frente às disfunções desta região do aparelho digestivo. ⁽¹⁾.

Após uma refeição, o estômago e intestino apresentam um padrão de movimentos e secreções chamado de padrão pós-prandial, como as funções principais do estômago e intestino são armazenamento, digestão, transporte e absorção, os movimentos da parte oral e caudal do estômago são distintos e do ponto de vista funcional, o estômago é dividido em proximal formado pelo fundus e a parte proximal do corpo, e o estômago distal constituído pela parte distal do corpo e antro ⁽¹⁾.

Os movimentos gástricos são os peristálticos e são encarregados de triturar e misturar os alimentos. Esses movimentos só se encontram no estômago distal enquanto o estômago proximal apresenta somente atividade tônica ⁽²⁾. O estômago proximal é responsável pela acomodação do bolo alimentar e, em certo modo, pelo EG de líquidos, sendo que as variações nas contrações tônicas desta região são refletidas pelo tônus gástrico. ^(2,3).

Esse tônus é o resultado das ondulações das atividades estimuladoras e inibidoras (aumentando e diminuindo respectivamente) com participação do nervo vago. Assim, a diminuição do tônus gástrico diminui o EG de líquidos ⁽⁴⁾. De modo contrário, uma redução do fundo gástrico aumenta esse tônus e com isso aumenta o EG de líquidos ⁽⁵⁾. No caso do EG de alimentos sólidos a atividade peristáltica que gera este processo é responsabilidade do estômago distal, que reduz os fragmentos sólidos a um tamanho adequado. Juntamente com os líquidos, ultrapassa o piloro a través da propulsão, evacuação e retro-pulsão e pelo aumento da retro-pulsão e trituração ^(2,3). Embora o piloro não seja uma zona de alta pressão, ele contrai independentemente alterando a resistência ao fluxo entre o estômago e duodeno ⁽²⁾.

A pressão intragástrica é determinada por dois fenômenos. O primeiro é o relaxamento receptivo, que ocorre imediatamente depois da deglutição em que o estômago proximal relaxa durante aproximadamente 20 segundos e a pressão no interior do estômago diminui por alguns instantes. O segundo é o relaxamento adaptativo ou de acomodação, ocorre quando o alimento chegado ao estômago produz um aumento da pressão e com isto são ativados sensores de tensão, os quais, por meio de um reflexo vago-vagal, levam ao relaxamento do estômago proximal, mantendo a pressão nos níveis adequados. O relaxamento adaptativo do estômago proximal contribui para realizar a função de armazenamento do estômago.

Quando a pressão sobrepassa certo valor surge à sensação de saciedade. Imediatamente após o início de uma refeição o estômago distal apresenta contrações peristálticas com ritmo irregular, seguido de contrações que se estabilizam a um ritmo de três por minuto. As contrações da parte distal do estômago são contrações fásicas, do tipo peristáltico e se distribuem do corpo para o antro. Esses movimentos peristálticos são produzidos pela excitação de sensores de tensão no órgão, via reflexo vago-vagal, e têm como função misturar e triturar o conteúdo sólido dos alimentos, conduzindo-os até o piloro ⁽⁶⁾.

Quando a contração peristáltica do antro chega ao piloro, este se fecha e o quimo retorna em direção oral e só pode sair do estômago uma pequena quantidade de quimo líquido, contendo partículas sólidas de tamanhos adequados. ⁽⁷⁾. Quando a concentração de carboidratos, gorduras ou proteínas no duodeno é muito alta o estômago apresenta um padrão de contrações rítmicas, às vezes com a mesma frequência do antro, às vezes com a do duodeno e às vezes com uma combinação de ambas. Isto evita que o intestino delgado seja sobrecarregado de alimentos ricos em calorias ⁽⁸⁾.

As contrações duodenais ocorrem no momento de despolarização das células musculares lisas as quais são quatro vezes mais freqüentes no duodeno do que no antro gástrico. O duodeno, após uma contração do antro, pode-se contrair uma ou várias vezes, e, somente quando uma contração peristáltica do estômago atinge o piloro se contraem as células musculares lisas no duodeno. Isso é chamado de coordenação antro duodenal. A coordenação antro duodenal

tem, provavelmente, um papel importante no esvaziamento gástrico (EG), quando todos os alimentos, com exceção dos que não são digeríveis, saem do estômago, parando os movimentos do estômago e do duodeno ⁽⁹⁾.

Toda esta atividade motora do estômago, piloro e duodeno têm por finalidade transportar os alimentos na direção do intestino delgado em quantidades adequadas. O tempo de permanência da refeição no estômago depende entre outras coisas do valor osmótico e calórico da refeição. No caso das refeições líquidas, o EG se inicia imediatamente ⁽²⁾. As características de uma refeição como quantidade, consistência, presença de partículas sólidas, osmolaridade, conteúdo calórico e a composição (carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas, etc) influenciam o EG. O esvaziamento é mais lento para líquidos hiper e hipotônicos, em consequência da ativação dos sensores osmóticos no duodeno ⁽⁸⁾.

Para coordenar o EG existem também, no intestino delgado sensores químicos para aminoácidos (como o L-triptofano), para açúcares, gorduras e pH. Por meio das vias nervosas aferentes são inibidos os movimentos gástricos e contração do piloro, retardando assim o esvaziamento ⁽⁶⁾. O controle do EG também é realizado pela ação de hormônios como gastrina, secretina, peptídeo gástrico inibidor (GIP), sendo o mais importante deles a colecistocinina (CCK) que é liberada pela mucosa do jejuno em resposta à presença de gorduras no quimo. A gastrina e a colecistocinina diminuem as contrações e aumentam a distensibilidade gástrica, porém só o efeito da CCK parece ser fisiológico ⁽²⁾.

Contudo, recentemente foram apresentadas evidências da participação da 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina, neste controle, através da ativação dos receptores 5HT₃ ⁽¹⁰⁻¹⁶⁾.

Quase todas as atividades do tubo digestivo são realizadas, praticamente, sem a participação direta do sistema nervoso central (SNC) constitui exceção à fase oral da deglutição e a defecação, pois o restante das funções são autônomas e controladas pelo sistema nervoso simpático e parassimpático (inervação extrínseca) e por células nervosas na parede gástrica e intestinal que constituem o sistema nervoso entérico (inervação intrínseca) ⁽²⁾.

A inervação eferente parassimpática se realiza principalmente por meio do nervo vago. Os corpos celulares do nervo vago estão no tronco cerebral. Dai partem dois fascículos (nervo vago anterior e posterior) que passam através do diafragma e se ramificam até o estômago, intestino delgado e colon ascendente. Por outro lado, grande parte das fibras do nervo vago são fibras aferentes sensoriais, que informam ao cérebro sobre o estado do estômago e do intestino. A importância da inervação vagal fica evidente após vagotomia, quando os movimentos gástricos e intestinais são insuficientes ou inexistentes. As fibras parassimpáticas vão diretamente do sistema nervoso central ao intestino e terminam nos plexos mientéricos e submucoso, sendo o neurotransmissor principal a acetilcolina ⁽²⁾.

O neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) mais importante é o ácido gama-amino-butírico (GABA). No SNC foram identificados receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C ⁽¹⁷⁻²⁰⁾. A ativação dos receptores GABA_B, tendo como sistema transdutor as proteínas G_{αi}/G_{αo} da membrana, tem como efeito inibição da adenylyl cyclase, aumento da condutância do canal de K⁺ e diminuição da condutância do canal de Ca⁺⁺ ^(18,20,21).

A ativação dos receptores GABA_B na localização pós-sináptica leva ao aumento prolongado da condutância do canal de K⁺, este canal é o responsável pela geração de eventos inibitórios GABAérgicos lentos no SNC ^(20,22). Estes receptores GABA_B, na localização pré-sináptica estão envolvidos na regulação da liberação de transmissores, sendo que o principal efeito do baclofen (β-p-chlorophenyl-GABA), um agonista para receptores GABA_B, é reduzir a liberação de transmissores sinápticos estimuladores e inibitórios.

O baclofen, através do nervo vago, bloqueia os estímulos inibitórios sobre o estômago aumentando o tônus gástrico e a frequência e amplitude das contrações gástricas e duodenais ⁽²³⁻²⁵⁾.

Estas observações sugerem que receptores GABA_B atuam na modulação da atividade motora do estômago. Esta ação do baclofen foi observada em uma variedade de sinapses, reduzindo, por exemplo, a liberação de noradrenalina, dopamina, acetilcolina, serotonina, glutamato e aspartato ⁽²⁶⁾. Nesta mesma localização também foi observado que pode funcionar como auto-receptor,

reduzindo a liberação de GABA e, desta forma, diminuindo a inibição pós-sináptica determinada pela ativação dos receptores GABA_A ^(20,22,26). Os receptores GABA_B no cérebro são heterodímeros de duas subunidades GABA_{B(1)} e GABA_{B(2)}. Todos conhecidos receptores agonistas e antagonistas competitivos ligam-se somente à subunidade GABA_{B(1)}, enquanto a ativação da proteína G é facilitada através da subunidade GABA_{B(2)} ⁽²²⁾.

O complexo dorsal do vago (CDV) é formado pelo núcleo do trato solitário (NTS) com neurônios que recebem informações de vias aferentes, área postrema e núcleo dorsal do vago (NDV) onde estão localizados os motoneurônios estimuladores e inibitórios, cujos axônios constituem as vias eferentes do nervo vago ⁽²⁷⁾. A inervação simpática vem da parte tóraco-lombar da medula espinhal. As ramificações desta parte chegam até os gânglios simpáticos (entre outros o gânglio celíaco) formando sinapses com células nervosas pós-ganglionares cujas fibras seguem os nervos abdominais e terminam no plexo intramural. A noradrenalina é o principal neurotransmissor secretado pelas terminações nervosas simpáticas. A estimulação do sistema nervoso simpático inibe a atividade do tubo gastrintestinal e determina efeitos essencialmente opostos aos do parassimpático. Por conseguinte, uma forte estimulação do sistema simpático pode bloquear por completo o trânsito do alimento no trato gastrintestinal ⁽²⁾.

Na parede do tubo digestivo estão o plexo mioentérico e o plexo submucoso, que formam conjuntamente o sistema nervoso entérico (SNE). O plexo

mioentérico esta localizado entre a capa muscular circular e a capa muscular longitudinal e o plexo submucoso esta na submucosa. O plexo mioentérico controla, principalmente, os movimentos gastrintestinais, enquanto o plexo submucoso é importante no controle da secreção e do fluxo sanguíneo, além de desempenhar numerosas funções sensoriais, recebendo sinais do epitélio intestinal e de receptores de estiramento na parede intestinal ⁽⁷⁾.

É conhecido que vários fatores podem interferir no EG além da composição da refeição, entre estes os que determinam alterações no volume sanguíneo. Assim, algumas situações em que há alterações hemodinâmicas, modificam a velocidade do EG e a função motora do trato gastrintestinal ⁽²⁸⁻³⁰⁾. O procedimento cirúrgico é uma das condições que induz ao *stress* ^(31,32). Por outro lado, sabe-se que em ratos o *stress* agudo induz retarde do EG ^(33,34).

Estudando esse fenômeno, RAMIREZ-NUNEZ e colaboradores ⁽³⁵⁾, não observaram esse retarde nos animais do grupo *SHAM*, e especula-se que o período de 24 horas foi suficiente para os animais terem se adaptado, neste aspecto à agressão, também, que no grupo INF foi necessária interação dos procedimentos (anestesia+cirurgia) com o infarto recente para ocorrer diminuição do EG. Este fenômeno pode ser interpretado como decorrência de *stress* aditivo anestesia+cirurgia+infarto, condições que separadamente são capazes de induzi-lo.

O estresse causa elevação dos níveis de cortisol, os quais perduram enquanto o estímulo estressante persiste. Os corticosteróides, responsáveis pelas defesas orgânicas, pelo controle das reações alérgicas e pelo equilíbrio do sal e da água, entre outras funções, são sintetizados a partir do colesterol no córtex da glândula suprarrenal. Para que as suprarrenais liberem o cortisol, que é o principal corticóide circulante é necessário à ação de outro hormônio secretado na hipófise. Esse hormônio é o hormônio corticotrófico (ACTH), de origem hipofisária (36).

O *stress* de qualquer natureza estimula várias respostas hormonais adaptativas, particularmente nas primeiras 72 horas, entre elas uma descarga de epinefrina e norepinefrina na corrente sangüínea (31). Como é conhecido que alterações hemodinâmicas agudas podem interferir no EG (37) é tentador especular que estas sejam responsáveis pelo efeito sobre o EG. O fator hipotalâmico que controla a síntese do ACTH é o hormônio liberador da corticotrófina (CRH) que é sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV). A secreção do CRH, elaborado no NPV, é controlada por, pelo menos, dois tipos de estímulos: o estresse e o relógio biológico, responsável por todo ritmo circadiano do organismo. Para o controle da liberação-inibição hormonal existe um mecanismo chamado de *feedback*, ou seja, o próprio nível elevado de cortisol na circulação proporciona a inibição da liberação de CRH e de ACTH que, finalmente resultará na inibição do próprio cortisol (36).

Uma condição patológica em que ocorre comprometimento hemodinâmico é o infarto do miocárdio. A diminuição súbita no fluxo sanguíneo coronariano, que determina o infarto do miocárdio, ocorre após oclusão de uma artéria coronária principalmente devido à aterosclerose. As estenoses significativas de artéria coronária, com desenvolvimento lento, não precipitam o infarto do miocárdio, em virtude de desenvolvimento de uma rica rede colateral com o passar do tempo. O infarto ocorre quando um trombo de artéria coronária desenvolve-se rapidamente em um local de lesão vascular ⁽³⁸⁾.

A isquemia do miocárdio estimula receptores cardíacos que podem ativar reflexos como taquipneia, bradicardia, e hipotensão ⁽³⁹⁾. Existe uma relação funcional entre o intestino e o sistema cardiovascular, e isso pode ser observado quando na hipervolemia, o EG e o trânsito GI de uma refeição líquida são retardados. ^(40,41).

Em trabalho anterior, avaliando o efeito do infarto experimental recente do miocárdio em ratos sobre o EG, os resultados mostraram que para este estudo agudo os animais do grupo infarto (INF) apresentaram RG significativamente mais elevada em relação aos animais controle do grupo Naive (NA) e não em relação ao grupo Sham (SH). Não houve diferenças entre os animais do grupo SH em relação aos do grupo NA, mostrando que o EG e o trânsito GI de uma refeição de prova líquida é retardada 24 horas após a técnica experimental de infarto do miocárdio. ⁽³⁵⁾.

Ratos com infarto recente do miocárdio (IAM) apresentam valores aumentados da pressão venosa central (PVC). Os níveis do peptídeo átrio natriurético (ANP) estão aumentados em indivíduos com insuficiência cardíaca ^(42,43). O ANP inibe a permeabilidade e motilidade do intestino. É possível que o IAM libere peptídeos que podem, também, modular a atividade do sistema nervoso autonômico ou interferir diretamente com a contração da musculatura lisa do intestino. As vias não adrenérgicas e não colinérgicas estão envolvidas na inibição da motilidade do intestino induzidos pela hipervolemia, ⁽⁴⁰⁾.

Também é provável que a hipotensão arterial devido ao sangramento possa estar associada com EG rápido em lugar de apresentar retarde do EG, ⁽⁴⁴⁾. A insuficiência cardíaca congestiva devido a IAM pode provocar diferentes respostas no sistema nervoso autonômico. Assim, a atividade nervosa simpática está aumentada no IAM ⁽⁴⁵⁾.

Nos modelos experimentais apresentados, se trabalha a hipótese de que o retarde do EG e o transito GI, após IAM, é o resultado do aumento da atividade simpática. Nesta observação de Ramirez-Nunez ⁽³⁵⁾, não foram avaliados os mecanismos envolvidos no fenômeno. Assim, no presente estudo propõe-se avaliar alguns mecanismos que poderiam participar no retarde do esvaziamento gástrico de liquido em ratos com infarto recente do miocárdio.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos neurais envolvidos no retardo do esvaziamento gástrico de líquidos em ratos induzidos através do infarto recente do miocárdio.

2.2 Objetivos específicos

1) Avaliar em ratos submetidos a infarto recente do miocárdio a complacência gástrica;

2) Avaliar no retarde do EG observado no infarto recente de miocárdio em ratos a participação:

- i) Do nervo vago;
- ii) Dos receptores GABA_B agonistas no SNC;
- iii) Dos receptores alpha-adrenérgicos;
- iiii) Do PVN do hipotálamo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 220 – 300 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Os animais tiveram um período de adaptação de quatro semanas às condições do laboratório, com temperatura controlada (22 – 26°C) e ciclo artificial de luz de 12 horas, recebendo água e ração *chow, ad libitum*, durante todo o tempo do experimento. O protocolo de estudo foi aprovado pelo SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) (www.ib.unicamp.br/CEEA/principios) (Protocolo N° 1021-2).

2. Delineamento Experimental

Para a medida da complacência gástrica, vinte e quatro horas antes, os animais foram divididos em três grupos: ratos submetidos a infarto do miocárdio (INF), submetidos ao infarto simulado (SH) e sem nenhum procedimento (NAIVE).

Para avaliar a participação do nervo vago, duas semanas antes os animais foram divididos em dois grupos: Um com vagotomia (VGX) subdiaphragmática, nos quais foram seccionados os ramos dorsal e ventral do nervo vago, e outro com cirurgia simulada (SH). Vinte quatro horas antes do procedimento do EG cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: o primeiro submetido a infarto e o

outro o sham com infarto simulado. O EG foi avaliado através da determinação da retenção gástrica (RG), em %, de uma refeição de prova salina.

Para o estudo do efeito do baclofen, em todos os animais foi implantado uma sonda metálica no ventrículo lateral do cérebro uma semana antes. Vinte e quatro horas antes da avaliação do EG os animais foram divididos em dois grupos: um grupo no qual foi feito o procedimento de infarto do miocárdio, outro grupo no qual foi simulado o processo cirúrgico sem ligadura das artérias coronárias (SH). Cada um dos grupos foi dividido em 2 subgrupos: Um subgrupo que recebeu tratamento com baclofen (Bac 1) 1µg diluído em 10 µl de veículo (solução salina) via intracerebroventricular (*icv*) e outro subgrupo tratado com 10 µl de veículo (Bac 0). Após 10 minutos da injeção, foi avaliada a RG, em %, de uma refeição de prova salina.

No estudo do bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos os ratos foram divididos em 2 grupos: Infartados e sham em que foi simulado o procedimento cirúrgico. Após 24 horas, cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos: Tratados *iv* com 1mg/kg de Prazosin (Pra 1) e outro com veículo solução salina estéril (Pra 0), administrada através da veia da cauda. Após 15 minutos da injeção, foi avaliada RG, em % de uma refeição de prova salina.

Para o estudo participação do PVN do hipotálamo os animais foram divididos duas semanas antes, em dois grupos: um com lesão eletrolítica do núcleo para ventricular (PVN) e outro grupo sem lesão do núcleo para ventricular

(SH) nos quais foi realizado o mesmo procedimento sem sofrerem descarga da corrente elétrica. Vinte quatro horas antes do procedimento do EG cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: O primeiro submetido a infarto (INF) e o outro o sham (SH), com infarto simulado. O EG foi avaliado através da determinação da retenção gástrica (RG), em %, de uma refeição de prova salina

3. Drogas

- Solução salina estéril (Isofarma, Industrial Farmacêutica Ltda., Precabura Eusébio – CE, Brasil)
- Ketamine (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda.)
- Xylazine (Bayer S.A. São Paulo, SP, Brasil)
- Thiopental sódico (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos, Ltda.)
- Baclofen (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Prazosin (Pfizer, Guarulhos, SP, Brasil)
- Éter etílico (CHEMCO Indústria e Comércio LTDA, Campinas, SP, Brasil)

MÉTODOS

1. Medida da Complacência Gástrica

Para este estudo, vinte e quatro horas antes, os animais foram divididos em três grupos: ratos submetidos a infarto do miocárdio (Inf), submetidos ao infarto simulado (Sh) e sem nenhum procedimento (Naive).

Para medida do volume e da complacência gástrica foi utilizada a técnica descrita por Bustorff-Silva et al, 1999, detalhada a seguir: Após jejum de 24 horas nos animais sob anestesia (ketamine + xylazine, *ip* 85 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente) foi realizada traqueostomia, incisão abdominal, lavagem do estômago após ligadura do piloro, fixação de tubo oro-gástrico no esôfago distal preenchido com solução salina.



Figura 1. Traqueotomia e incisão abdominal.

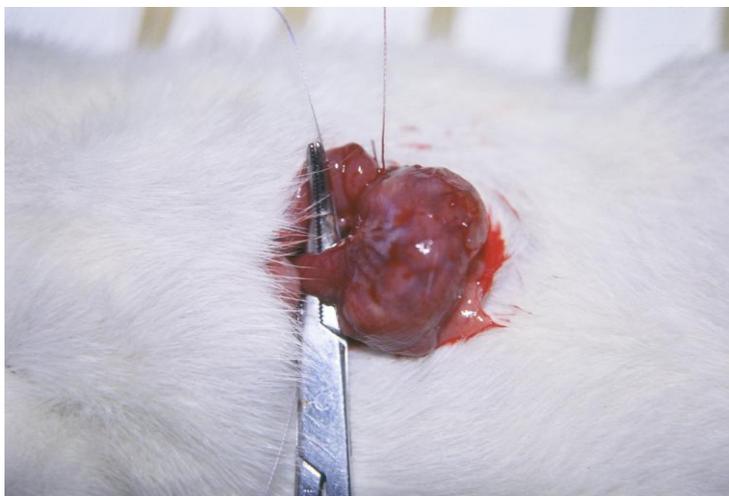


Figura 2. Ligadura do piloro para realizar lavagem do estômago.

E conectado, através de uma torneira de três vias, a uma bomba de infusão (Bomba de infusão LF 2001, LIFEMED) e a um monitor de registro de pressão (Fisiografo Biomotor 7, BESE).

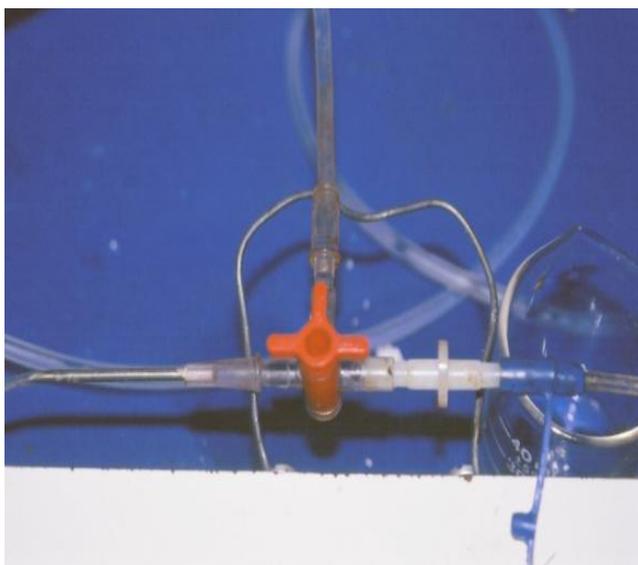


Figura 3. Torneira de três vias



Figura 4. Bomba de infusão

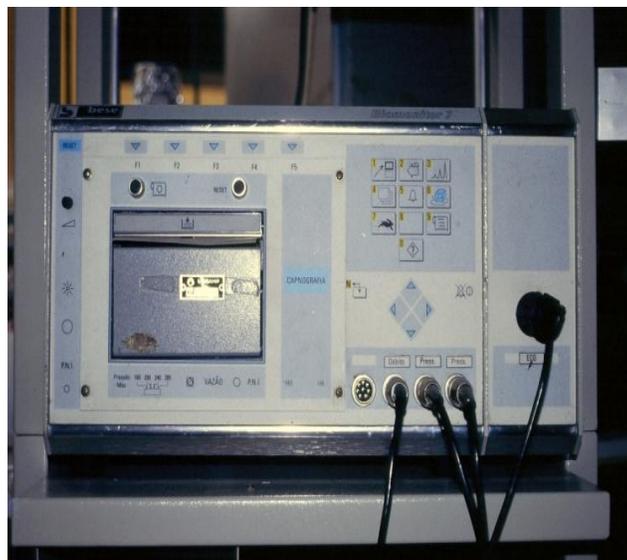


Figura 5. Fisiografo

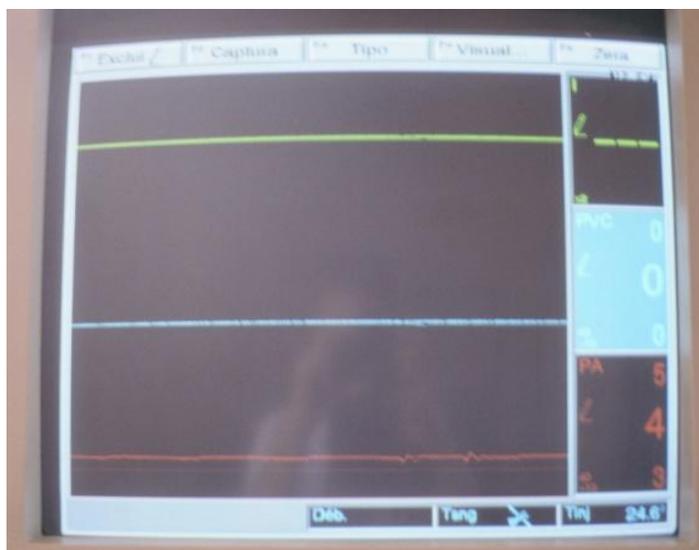


Figura 6. Monitor de registro

Após 30 minutos (min) para estabilização foi infundida no estômago solução salina a 37°C na velocidade de 1,5 ml/100g de peso/min, de forma intermitente, a cada 20 segundos (s) com intervalos de 1 min. Cada 20s (1/3 do volume) a infusão foi interrompida e o sistema equilibrado por 50s, com registro da pressão intragástrica (PIG). As PIG correspondentes a 0,5; 1,0 e 1,5 ml/100g de peso foram registrados. O estômago foi a seguir esvaziado e o procedimento repetido por mais duas vezes, com intervalos de 30 min. Os resultados de cada animal corresponderam à média das três medidas da PIG em cada ponto. Foram analisadas curvas de volume/pressão e a CG em ml/mmHg. A complacência gástrica foi determinada pela fórmula: $\text{complacência (ml/mmHg)} = \frac{V^1 - V^0}{P^1 - P^0}$, onde V^0 = volume inicial e V^1 = volume final; P^0 = PIG inicial e P^1 = PIG final.

2. Vagotomia subdiafragmatica

Duas semanas antes do estudo do EG, após jejum alimentar de 12 horas os animais foram sedados com thiopental sódico, na dose de 75 mg/kg peso vivo do animal, utilizando a via intraperitoneal. Após tricotomia na região abdominal foi feita uma pequena incisão aproximadamente de um centímetro seguindo a direção da linha Alba. Dentro da cavidade abdominal por visualização direta foi localizado o estômago como referência para identificar os ramos do nervo vago.

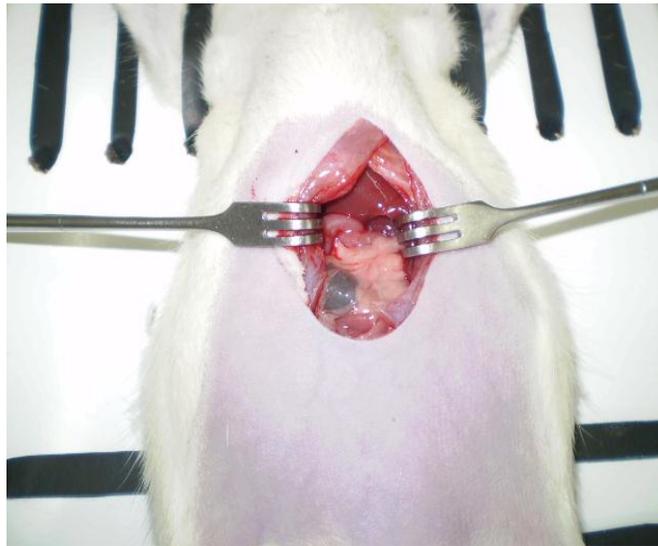


Figura 7. Incisão na região abdominal

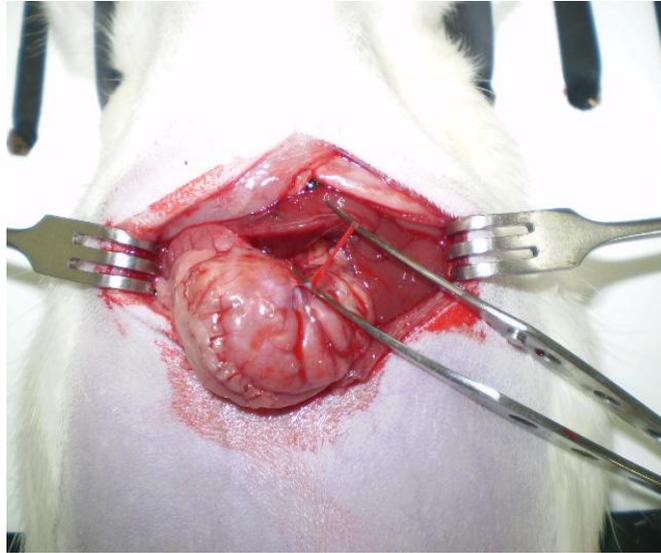


Figura 8. Secção dos ramos ventral e dorsal do nervo vago

Neste momento os animais foram divididos em dois grupos: Um com vagotomia (Vgx) subdiagramática, nos quais foram seccionados os ramos dorsal e ventral do nervo vago, e outro com cirurgia simulada (SH). Após o procedimento cirúrgico os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*.

Vinte quatro horas antes do procedimento do EG cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: o primeiro submetido a infarto (Inf) e o outro o sham (Sh) com infarto simulado. O EG foi avaliado através da determinação da retenção gástrica (RG), em %, de uma refeição de prova salina.

3. Injeção intra-cerebro-ventricular de baclofen

Oito dias antes do estudo do EG, cada animal foi submetido após sedação com thiopental sódico (75 mg/kg de peso), ao procedimento de implantação, dentro do ventrículo lateral direito de uma cânula (21G) de aço com comprimento de 15 mm, fixado no crânio com dois parafusos, resina acrílica polimerizada e um adesivo instantâneo (éster cianoacrilato). As coordenadas para a implantação foram: AP= -0.2mm, lateral direito= -1.5mm, e vertical= 4.2mm, todas as medidas foram feitas em relação ao bregma usando o Atlas Groot ⁽⁴⁶⁾.



Figura 9. Estereotático



Figura 10. Perfuração do crânio



Figura 11. Implantação da sonda de aço



Figura 12. Capacete de resina acrílica

Vinte e quatro horas antes da avaliação do EG os animais foram divididos em dois grupos: Um grupo no qual foi feito o procedimento de infarto do miocárdio (Inf), outro grupo no qual foi simulado o processo cirúrgico sem ligadura das artérias coronárias (SH). Cada um dos grupos foi dividido em 2 subgrupos: Um subgrupo que recebeu tratamento com baclofen (Bac 1) $1\mu\text{g}$ diluído em $10\mu\text{L}$ de veículo (solução salina fisiológica estéril) via intracerebroventricular (*icv*) e outro subgrupo tratado com $10\mu\text{L}$ de veículo (Bac 0), em 30 segundos, permanecendo o sistema conectado por mais 30 segundos ⁽⁴⁷⁾. Para injeção *icv*, foi utilizada uma cânula interna para micro-injeção (28G) conectada através de um tubo de polietileno a uma seringa de Hamilton de $50\mu\text{L}$. Após 10 minutos da injeção, foi avaliada a RG, em %, de uma refeição de prova salina.

Ao termino do estudo, todos os animais foram abatidos e, para confirmação da injeção no ventrículo lateral, foi injetado através da cânula, $10\mu\text{L}$ de solução de azul de Evans a 1%, através da cânula. Os cérebros foram removidos e fixados

em formol 10% por 24 horas. Os cérebros foram então cortados em cortes coronais e a injeção *icv* foi confirmada, quando o corante foi detectado no quarto ventrículo.

4. Bloqueio dos receptores alfa 1-adrenérgicos

Neste o estudo os ratos foram divididos em 2 grupos: Infartados (Inf) e sham (SH) em que foi simulado o procedimento cirúrgico. Após 24 horas, cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos tratados *iv* com 1mg/kg de Prazosin (Pra 1) e outro com veiculo solução salina estéril (Pra 0), administrado através da veia da cauda. Após 15 minutos da injeção, foi avaliada RG, em %, de uma refeição de prova salina.



Figura 13. Administração endovenosa do Prazosin

5. Lesão do núcleo paraventricular

Para o estudo da participação do PVN do hipotálamo os animais foram divididos 8 dias antes em dois grupos: Um com lesão eletrolítica do núcleo paraventricular (PVN) e outro grupo sem lesão do núcleo paraventricular (SH) nos quais foi realizado o mesmo procedimento sem sofrerem descarga da corrente elétrica.

Para o procedimento os animais foram sedados com thiopental sódico, 75 mg/kg de peso, utilizando a via intraperitoneal. Foi feita a lesão eletrolítica bilateral do núcleo paraventricular (NPVX), passando 0.5 mA de corrente elétrica durante 10 segundos, através de um eletrodo de Níquel/chromium, (0.25mm de diâmetro coberto com resina isolada exceto 0.1mm na ponta) localizada dentro do núcleo estereotaxicamente.



Figura 14. Lesionador eletrônico

As coordenadas para o local da lesão foram: Ântero-posterior (AP) -1.4 mm, lateral -0.5 e $+0,5$ mm, e vertical -8.0 mm nos pontos correspondentes ao ponto AP. todas as medidas foram feitas em relação ao bregma usando o Atlas Paxinos e Watson ⁽⁴⁸⁾. Os mesmo parâmetros foram utilizados para o grupo *sham*, exceto pela medida vertical, quando a profundidade é 7.5 mm, sem passagem de corrente elétrica.

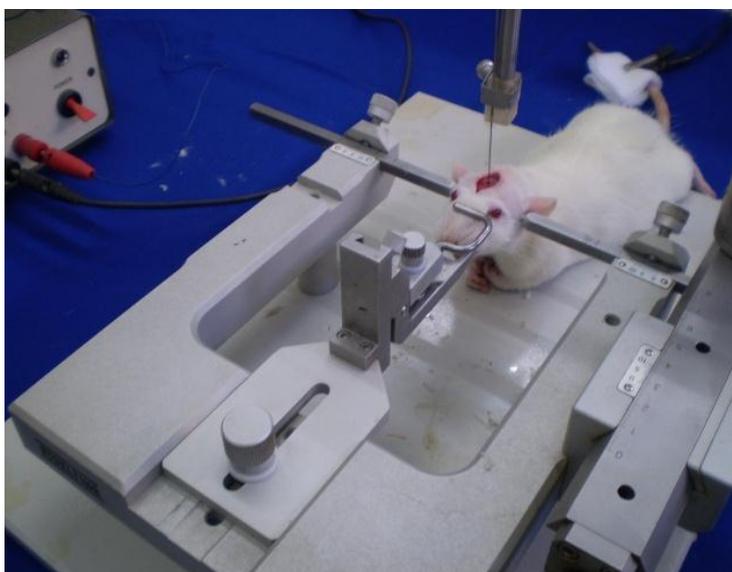


Figura 15. Passagem da corrente

Vinte quatro horas antes do procedimento do EG cada um dos grupos foi subdividido em dois subgrupos: o primeiro submetido a infarto (Inf) e o outro o sham (Sh) com infarto simulado. O EG foi avaliado através da determinação da retenção gástrica (RG), em %, de uma refeição de prova salina.

O local da lesão foi histologicamente confirmada no final de cada experimento, quando os animais foram abatidos. No grupo NPVX o cérebro foi retirado, congelado, obtidos cortes histológicos e corados com azul de toluidina. Para a confirmação do local das lesões, as seções foram comparadas com as figuras do atlas Paxinos e Watson ⁽⁴⁸⁾ sob o microscópio. Nos animais com cânula implantada no ventrículo lateral, o local foi localizado pela injeção *icv* de 10 µl de azul de Evans 1% no final do estudo do esvaziamento gástrico. Neste grupo, após o sacrifício o cérebro foi retirado, fixado em formol 10%, seccionado e a injeção *icv* foi confirmada quando a mancha foi encontrada no quarto ventrículo. Só foram inclusos na análises os animais que apresentarem lesão bilateral do núcleo para ventricular.

Técnica do Infarto do miocárdio

O infarto do miocárdio foi induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, segundo a técnica preconizada por Johns & Olson, 1954 ⁽⁴⁹⁾.

No procedimento foi utilizado instrumental de cirurgia geral, como tesoura de ponta aguda, pinça de dissecação dente de rato, 2 afastadores e 1 pinça adaptada com as pontas de algodão para segurar o coração fora do tórax. Os animais foram anestesiados via inalatória com éter etílico (CHEMCO Indústria e Comércio LTDA, Campinas). O procedimento cirúrgico foi o seguinte:

Após imobilização do animal foi feita tricotomia na região torácica e assepsia da área da cirurgia com álcool iodado 70%. O cirurgião localiza o apêndice xifóide, 1 cm aproximadamente para cima, e faz uma incisão na pele longitudinalmente a linha do esterno; Divulsão da pele com tesoura, para separar pele da capa muscular e afastar a pele; No passo seguinte foi feita outra incisão no músculo e divulsão com tesoura para afastar capa muscular do gradeado costal. Foi efetuada uma incisão no 4º espaço intercostal esquerdo, afastando uma costela da outra com ajuda de um pequeno afastador, o tórax é levemente comprimido com o polegar e o indicador, para que o coração seja retirado da cavidade torácica. A ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda foi realizada com fio 4.0 de surgilene, entre o cone da artéria pulmonar e o apêndice atrial esquerdo. Após este procedimento, o coração foi rapidamente recolocado dentro da cavidade torácica e o tórax e a parede suturada com fio algodão 3.0. Nos animais controles (*sham*) foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico que nos ratos infartados, mas não foi feita ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, nem retirado o coração para fora do tórax.

Após a cirurgia os ratos foram alocados em gaiolas individuais, em jejum, por 24 horas, exceto para água retirada 30 min antes do estudo do EG.

Determinação do esvaziamento gástrico de líquido

O EG foi avaliado através da determinação da retenção gástrica (RG) de uma refeição de prova (RP) salina marcada com fenol vermelho (6 mg/dl), volume de

1.5 ml/100g de peso de rato, 10 minutos após ter sido administrada por via orogástrica, utilizando técnica padronizada ^(50,51). Os procedimentos obedeceram a seguinte ordem:

A refeição de prova foi infundida através de uma seringa de vidro (volume máximo = 5 ml), acoplada a um cateter de polietileno que, por sua vez, é conectado a uma sonda metálica de 12 cm de comprimento e diâmetro interno de 2.0 mm, que apresenta na extremidade distal uma oliva multiperfurada. O volume da solução foi infundido por gravidade, em aproximadamente 10 segundos, com o animal em posição vertical;

Após a administração da solução, a sonda foi retirada e os animais permaneceram em gaiolas por 8 minutos e 30 segundos. Neste momento o animal foi colocado em campânula com éter etílico por 30 – 40 segundos; Após esse período, era colocada a sonda orogástrica, mantendo-se o animal anestesiado com inalação de éter através de um funil. O abdômen foi aberto no sentido longitudinal e o piloro clampeado, com pinça hemostática, exatamente 10 minutos após a infusão orogástrica. Todas as etapas foram cronometradas. O resíduo gástrico foi aspirado e a seguir, realizado 5 lavagens com 2 ml de água destilada por vez, tomando-se o cuidado de se aspirar sempre com a mesma seringa. Por visualização direta da víscera, confirma-se seu total esvaziamento. A sonda foi então retirada sobre pressão negativa e o animal abatido. O líquido obtido (resíduo gástrico) mais o líquido de lavagem foram transferidos para proveta graduada de 25 ml e os instrumentos de aspiração (sonda e seringa), foram lavadas três vezes, com um ml de água por vez, e o volume também acrescentado à proveta.

O volume total obtido foi anotado. Para determinação da retenção gástrica (RG) em porcentagem (%) foram tomados, do volume total recuperado, 2.0 ml e transferidos, em duplicata para balões volumétricos de 10 ml, aos quais foram acrescentados 5,0 ml de solução de fosfato trisódico, na concentração de 27,5 g/l. O mesmo procedimento foi feito com um ml de refeição de prova. O volume final de 10 ml foi completado com água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Espectrofotômetro B 382, MICRONAL) no comprimento de onda de 560 nM. Para o cálculo RG utilizou-se a seguinte fórmula:

$$RG = \frac{vrg \times arg}{vrp \times arp} \times 100$$

Onde: vrg = volume do resíduo gástrico; arg = absorbância do resíduo gástrico; vrp= volume da refeição de prova; arp = absorbância da refeição de prova.

Determinação da área de infarto do miocárdio

Uma vez realizado o estudo do EG e o animal abatido, o seguinte passo foi abrir o tórax, e retirar o coração e colocá-lo num Becker com solução fisiológica salina (NaCl 0,9%). Neste meio, o coração ainda batendo, é limpo pelo próprio bombeamento de todo sangue do interior da víscera. Após este procedimento o coração foi retirado desta solução e colocado sobre um papel de filtro para ser

secado. Posteriormente foi pesado em balança analítica, cortando os restos de fibras, vasos ou membranas aderidas.

Após a pesagem dos corações, eles foram injetados com gelatina higroscópica 50% (Bacto Gelatin), através da artéria aorta e levados para a geladeira por 30 minutos até endurecer a gelatina. Esta etapa tem a finalidade de não perder a forma da víscera, para posteriores cortes histológicos. Para a preparação das lâminas os corações foram cortados em duas metades, fazendo-se cortes transversais ao septo interventricular, tendo como pontos de referência a auriculeta esquerda, o sulco interventricular e a saída do ventrículo esquerdo. A seguir as duas metades são lavadas, pré – fixadas em formol a 10% por 24 horas em frascos individuais, devidamente identificados. A seguir o material é retirado e colocado numa solução de álcool 70% na qual permaneciam até a preparação das lâminas histológicas. Os seguintes passos foram seguidos no tratamento do tecido, utilizado o aparelho diafanizador de tecidos Citadel 1000 (Shadow): Passado duas vezes em álcool á 70% com tempo de banho (imersão) por uma hora cada banho; um banho em álcool 80% por uma hora; um banho em álcool 90% por uma hora; três banhos em álcool 99,5% (absoluto) por 1 hora cada banho; três banhos em xilol – histológico por uma hora cada banho; Para finalizar dois banhos em parafina líquida à 60°C de temperatura, uma hora cada banho. Foram realizados um total de 12 banhos/12horas, com o intervalo para cada banho de três segundos. No processo de inclusão do material utilizando o aparelho auto – inclusor Leica EG-1160 foram obedecidas às seguintes etapas: Após o tratamento, as cápsulas são repousadas em parafina derretida a 65°C de temperatura, num

tempo aproximadamente de 15/20 minutos. Inclusão em fôrmas, com a impregnação do material na parafina líquida a 63°C e identificados com etiquetas. Na confecção das lâminas foram seguidos os seguintes passos: Os blocos de parafina foram repousados em gelo, feitos os cortes de 5 µm (micrometros), passados pelo banho histológico (água aquecida a 50°C) para estiramento uniforme do corte, pescando em lâminas de vidro, lavadas em detergente neutro (Extran). Após, são levados para estufa histológica a 55°C de temperatura, num tempo aproximadamente de 24 horas. A última fase deste processo é a coloração pela hematoxilina - eosina na seguinte seqüência: A lâmina em temperatura ambiente é passada por dois banhos de xilol (5 minutos cada banho) para desparafinar. A seguir é passada duas vezes por álcool 99,5% (absoluto) e lava-se em água corrente por cinco minutos para hidratar; Deixada em imersão de solução de Bouin por uma hora na estufa a 60°C ou, preferencialmente, deixar por uma noite em temperatura ambiente. Lava-se em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin; Passa-se em água destilada. Cora-se pela solução de hematoxilina férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos. Lava-se em água corrente por 10 minutos e passa-se em água destilada e é corada pela solução de Escarlata de Biebrich por cinco minutos. Passa-se por água destilada. Diferenciação pela solução de ácido fosfotungstíco – fosfomolibídico durante 10 a 15 minutos. Passa-se por água destilada e cora-se pela solução de azul de anilina durante 5 a 10 minutos. Lava-se em água destilada. Passa-se pela solução de ácido acético glacial 1% por três a cinco minutos. Passa-se por água destilada e por último após desidratação, diafanização e montada em resina (Entellan) e colocado lamínulas 24x32mm e finalmente secada.

No resultado final o núcleo é corado em negro, o citoplasma, queratina, fibras musculares, fibras intercelulares coradas em vermelho, e o colágeno e muco corados em azul. Feita a lâmina histológica o próximo passo foi medir a área de infarto do ventrículo esquerdo. As lâminas com os cortes foram escaneadas, utilizando um aparelho HP Scanjet Automatic Document Feeder e analisados em um microcomputador utilizando-se um processador de imagem denominado SCION. Com o SCION a imagem é projetada na tela e com o cursor seleciona-se a área a ser medida (medida manual). Para isto primeiro contorna-se a região de interesse, seleciona-se a ferramenta comando de medida, o qual calculará a área, dando o mínimo e o máximo valor de área de infarto.

Análise estatística

Na análise estatística foi empregado a ANOVA, seguido do teste de Tukey para comparação entre os pares, quando necessário. O valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para ambos os testes.

4. RESULTADOS

Estudo da medida Complacência Gástrica

Na figura 1 estão às curvas de volume/pressão, mostrando que não houve diferença significativa de pressão intragástrica entre os três grupos nos três pontos de medida da PIG (ANOVA, $P > 0,05$) e em complementação as CGs não apresentaram diferenças significativas (ANOVA, $P > 0,05$) quando comparados entre si (média \pm SEM, grupo INF= $0,16\pm 0,03$ ml/mmHg, N=9, grupo SHAM = $0,17\pm 0,03$, N=9, grupo NAIVE = $0,16\pm 0,01$, N=8). Os resultados da área de infarto individuais poderão ser observados em apêndice

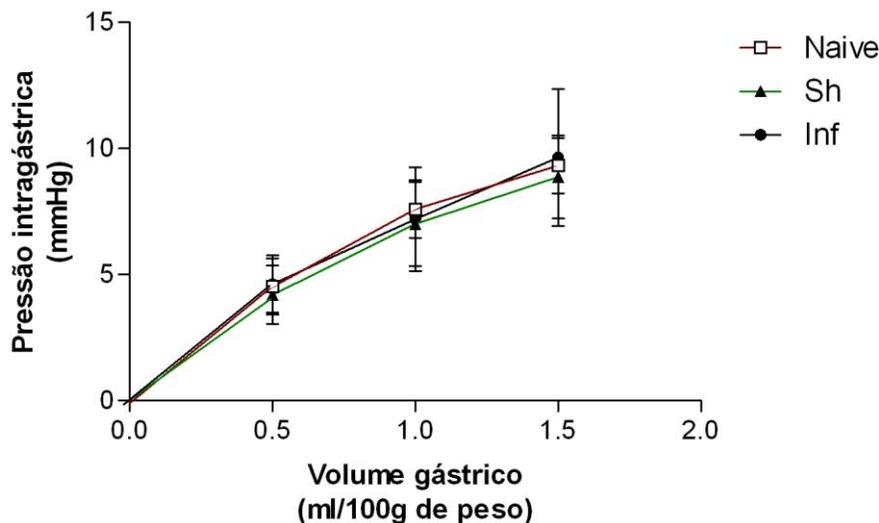


Figura 16. Curva de volume/pressão após instilação intragástrica de volumes crescentes de salina em ratos previamente infartados (Inf) N=9, ratos com cirurgia simulada Sham (Sh) N=9 e animais sem nenhum procedimento (Naive) N= 8. Os valores são expressos em média \pm SEM; $P > 0,05$.

Estudo da Vagotomia

Na figura 2 os resultados observados indicam que houve diferença significativa das RG (%) entre os subgrupos SH+Sh vs SH+Inf ($36,6 \pm 2,0\%$, N=10 e $48,0 \pm 2,3\%$, N=15, respectivamente), indicando que o infarto determinou retarde do EG nos animais com vagotomia simulada em relação aos seus controles. Por outro lado, o subgrupo Vgx+Inf apresentou RG ($28,7 \pm 2,8\%$, N=11) significativamente menor em relação ao subgrupo SH+Inf e não diferiu do subgrupo Vgx+Sh ($25,9 \pm 1,5\%$, N=10), indicando que a vagotomia aboliu o efeito do infarto sobre o EG. Além disso, O grupo Vgx+Inf ($28,7 \pm 2,8$, N=11) apresentou RG 1,39 vezes maior que o grupo Vgx+Sh ($25,9 \pm 1,5$; N=10). Os resultados da área de infarto individuais poderão ser observados em apêndice

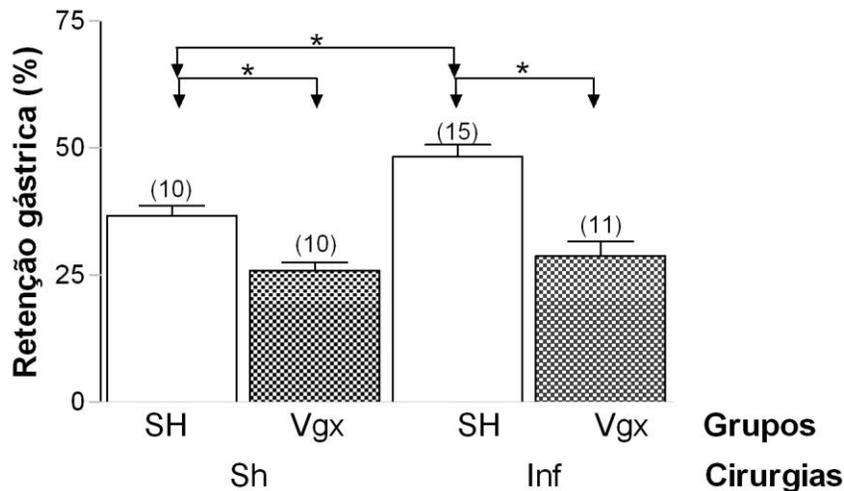


Figura 17. Retenção gástrica (%) determinada 10 min. depois da infusão de uma refeição de prova salina. Duas semanas antes do procedimento os animais foram submetidos à cirurgia Sham (SH) e vagotomia subdiafragmática (Vgx). Os ratos de cada grupo foram infartados (Inf.) ou sofreram cirurgia simulada (Sh). Os valores são expressos em média \pm SEM; * $p < 0,05$.

Estudo do efeito da injeção intracerebroventricular de baclofen

Na figura 3 os resultados da RG indicam que houve diferença significativa entre os animais do grupo SH+Sal e SH+Bac (média±SEM=32,0±2,9%, N=9 e =17,8±2,6%, N=11, respectivamente) assim como também nos grupos Inf+Sal e Inf+Bac (40,2±2,1%, N=11 e 26,0±3,3%, N=10, respectivamente), não houve diferenças significativas entre os grupos SH+Sal e Inf+Sal (média±SEM=32,0±2,9%, N=9 e =40,2±2,1%, N=11, respectivamente). Além disso, O grupo SH+Bac (17,8±2,6, N=11) apresentou RG 1,25 vezes maior que o grupo Inf+Bac (26,0±3,3; N=10). Sugerindo que o baclofen não modificou substancialmente o retarde do EG no grupo infartado. Os resultados da área de infarto individuais poderão ser observados em apêndice

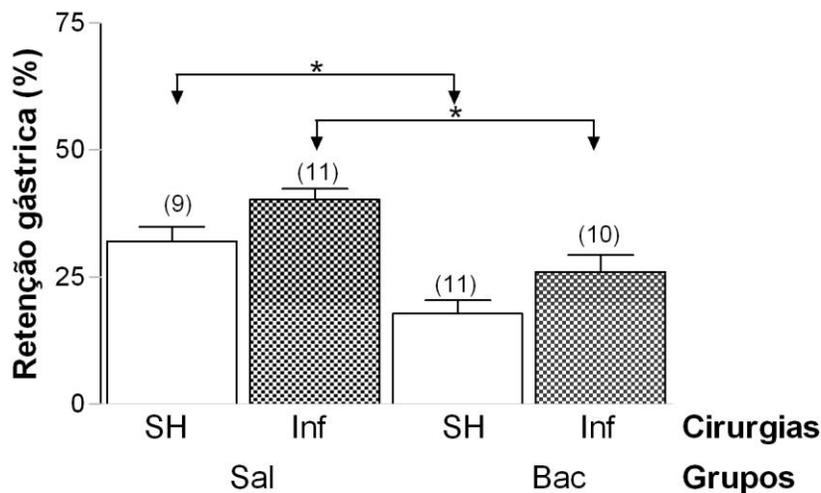


Figura 18. Retenção gástrica (%) determinada 10 min. depois da infusão de uma refeição de prova salina. Duas semanas antes do procedimento os animais foram submetidos à cirurgia Sham (SH) e Infarto do miocárdio (Inf). Os ratos de cada grupo foram tratados com solução salina 0,9% (Sal) e Baclofen (1µg/animal). Os valores são expressos em média ± SEM, *p<0,05.

Estudo do efeito do prazosin

Na figura 4 os resultados observados mostraram que o grupo Inf+Sal apresentou RG significativamente maior (média±SEM= 42,1±2,4%, N=10) da refeição líquida quando comparados aos ratos SH+Sal (30,5±1,3%, N=11), como observado em trabalhos anteriores. No entanto, quando comparamos o grupo Inf+Pra (22,0±1,5%, N=10) com o grupo SH+Sal (30,5±1,3%, N=11) esse efeito desapareceu. Além disso, O grupo Inf+Pra (22,0±1,5, N=10) apresentou RG duas vezes menor que o grupo Inf+Sal (42,1±2,4; N=10), enquanto que os ratos SH+Pra (22,3±1,8%, N=12) apresentaram RG menor que o grupo SH+Sal (30,5±1,3%, N=11) numa proporção de 0,7 vezes menor. Os resultados da área de infarto individuais poderão ser observados em apêndice

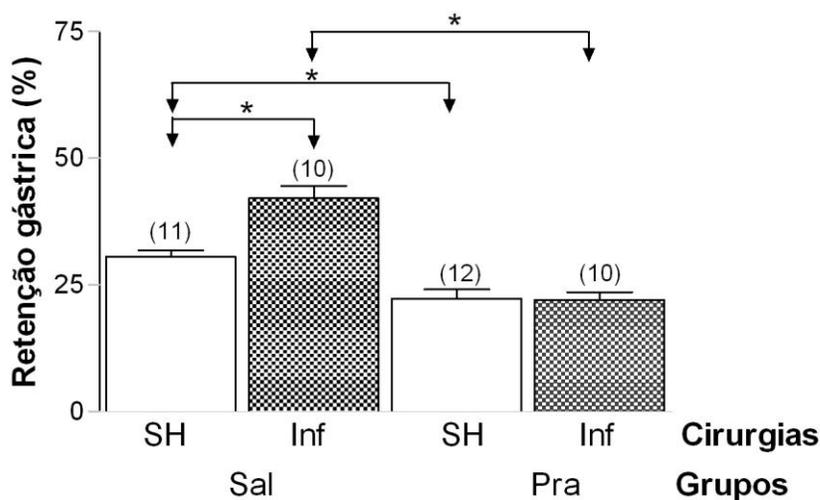


Figura 19. Retenção gástrica (%) determinada 10 min. depois da infusão de uma refeição de prova salina. Duas semanas antes do procedimento os animais foram submetidos a cirurgia Sham (SH) e Infarto do miocárdio (Inf). Os ratos de cada grupo foram tratados com solução salina 0,9% (Sal) e Prazosim (1mg/kg). Os valores são expressos em média ± SEM, *p<0,05.

Estudo da lesão do Núcleo Paraventricular

Na figura 5 os resultados observados sugerem que houve diferença significativa das RG (%) entre os subgrupos SH+Sh (média±SEM=32,1±1,9%; N=10) vs SH+Inf (41,2±1,7%; N=12) indicando que o infarto determinou retarde do EG nos animais com lesão simulada em relação aos seus controles. Assim mesmo, o grupo PVN+Inf (25,0±3,0%; N=8) apresentou RG 1,8 vezes menor em relação ao grupo PVN+Sh (28,5±2,9%; N=8), sugerindo que a lesão do núcleo paraventricular não modificou substancialmente o redarde do EG no grupo infartado, abolindo o efeito do infarto sobre o EG. Os resultados da área de infarto individuais poderão ser observados em apêndice

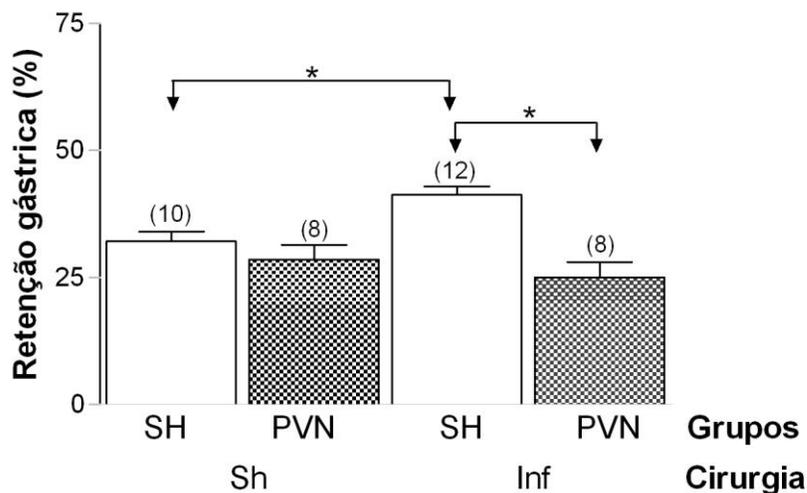


Figura 20. Retenção gástrica (%) determinada 10 min depois da infusão de uma refeição de prova salina. Duas semanas antes do procedimento os animais foram submetidos à cirurgia Sham (SH) e lesão eletrolítica do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Os ratos de cada grupo foram infartados (Inf) ou sofreram cirurgia simulada (Sh). Os valores são expressos em média ± SEM, *p<0,05.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do EG, com relação ao infarto recente do miocárdio apresentados por Ramirez-Nunez e colaboradores ⁽³⁵⁾, mostraram que os animais do grupo INF apresentaram RG significativamente mais elevada em relação ao grupo NA, concordando com os resultados apresentados por Ferreira de Queiroz *et al* ⁽⁵²⁾, que também concluíram que o infarto recente do miocárdio em ratos inibe o EG de líquido, e esse fenômeno apresenta uma correlação positiva com a área de infarto. Por outro lado também foi observado em trabalho anterior que não houve diferença significativa na RG do grupo INF quando comparado com o grupo SH, fenômeno que não foi observado na comparação dos resultados da RG entre os grupos SH e NA.

A diminuição do tônus gástrico determina EG de líquido mais lento ⁽⁴⁾. Contudo, para as condições experimentais do presente estudo o infarto recente do miocárdio não induziu modificações no tônus gástrico em ratos. Entretanto, como o EG ocorre por uma ação coordenada do estômago, piloro e duodeno ⁽²⁾ é possível que o fator determinante do retardo do EG no infarto do miocárdio não atue diretamente no estomago. Camurça *et al* ⁽⁵³⁾ detectaram no infarto recente do miocárdio, em adição ao retardo do EG, que o transito de líquido no intestino delgado é mais lento. Não ficou claro se as duas disfunções são dependentes de um mesmo fenômeno ou o efeito sobre o EG é consequência do que ocorre após o estômago. Como não observamos alteração na CG, uma alternativa especulativa para explicar o retardo do EG de líquido no infarto do miocárdio seria

o aumento da resistência, de natureza desconhecida, ao fluxo da refeição em direção ao intestino delgado.

Malagelada e colaboradores ⁽⁵⁴⁾ concluíram que o retarde do EG e o retarde do transito GI sob as mesmas condições de infarto recente do miocárdio poderia estar relacionado ao aumento da complacência gástrica ou a um aumento da resistência duodenal, já que estudos clínicos prévios reportaram que pacientes com IAM apresentaram dilatação estomacal ⁽⁵⁵⁾.

Com a avaliação do EG não é possível estabelecer qual ação está envolvida nas situações em que ocorre aumento ou diminuição do esvaziamento. Através da determinação do volume e da complacência gástrica podemos identificar o nível de participação do estômago neste fenômeno.

A etiologia do retarde do esvaziamento gástrico não é clara, mas acredita-se que resulta de uma anormal motilidade gástrica. A melhora do esvaziamento gástrico pode ser alcançada através da diminuição da resistência do fluxo ou melhorar a motilidade gástrica. Quando há uma combinação da diminuição da motilidade gástrica e obstrução ao fluxo gástrico, pode ocorrer um aumento da pressão intragástrica. A melhora no esvaziamento gástrico após fundoplicatura gastroesofágica esta associada a uma significativa diminuição no volume gástrico e complacência pós-operatória, resultando em um aumento da pressão intragástrica após alimentação ⁽⁵⁾, Uma observação importante a partir dos estudos realizados por Bustorff-silva et al, ⁽⁵⁾, é que a melhora no esvaziamento

gástrico produzido pela funduplicatura gastroesofágica é temporária. Com a alimentação, o aumento da pressão intragástrica gradualmente aumenta o tamanho do estômago e tanto o volume gástrico e o comprimento lentamente retornam aos valores pré-operatórios. O retorno do esvaziamento gástrico aos valores pré-operatórios após funduplicatura gastroesofágica; tem sido demonstrado ocorrer tanto em animais de laboratório como em humanos.

Os animais com lesão eletrolítica do PVN e infartados apresentaram RG, significativamente, menor em relação aos animais com lesão simulada e infartados. Esta lesão não reduziu a %RG nos animais controles. A lesão do núcleo paraventricular abole o efeito de retarde apresentado pelo infarto sobre o EG. O núcleo paraventricular envia um número considerável de fibras descendentes diretamente para o núcleo motor dorsal do vago, assim como para os neurônios sensoriais vagais no núcleo do trato solitário. Esta constatação constitui uma evidência da importância da participação desta estrutura no retardo do EG no infarto. É possível que os resultados parciais obtidos com a vagotomia e o bloqueio α 1-adrenérgico ocorreram, em razão de que cada um destes procedimentos interferiu somente numa parte do conjunto de alterações, sob comando do PVN, que determina retardo do EG no infarto do miocárdio.

No estudo do efeito da injeção intracerebroventricular de baclofen foi observado que não houve diferenças significativas entre os grupos sham e infarto que receberam solução salina, fenômeno que foi observado nos grupos que receberam baclofen, indicando que a administração de baclofen *icv* aboliu o efeito

do retardo do EG observado no infarto recente do miocárdio em ratos. O baclofen no SNC aumenta o EG de líquido pela sua capacidade de bloquear, no CDV, os estímulos inibitórios mecânicos que atuam sobre o estômago proximal, veiculados por fibras aferentes do nervo vago ^(23,24). Como consequência, há aumento do tônus deste segmento funcional do estômago, levando a EG mais rápido da refeição salina. Desta forma, o que foi observado poderia ser esperado, considerando que o infarto não modificou a complacência gástrica e o baclofen pode ter determinado aumento do tônus com a mesma intensidade nos controles e infartados, superando inclusive a condição que determinou retardo do EG no infarto.

Os receptores pré-sinápticos GABA_B estão envolvidos com a regulação da liberação de neurotransmissores e o principal efeito do baclofen, seu agonista, é o de reduzir a liberação de transmissores sinápticos, excitatórios e inibitórios. Esta ação do baclofen tem sido observada em uma variedade de sinapses, reduzindo a liberação de noradrenalina, dopamina, acetilcolina, serotonina, glutamato e aspartato. ⁽¹⁸⁾. Os receptores GABA_A e GABA_B estão distribuídos no SNC do rato em concentrações equivalentes em algumas áreas, com predominância do GABA_A na grande maioria e, GABA_B em outras ⁽²¹⁾.

Existe participação do nervo vago no retardo do EG. Em estudos de dissecação realizado em cães e espécimes humanos, observou-se que os vários ramos gástricos do nervo vago inervam a superfície anterior e posterior do estômago e não passam para o duodeno. No rato foi relatado que, mais tarde,

pequenos feixes nervosos ligam os dois ramos superficiais gástricos e do duodeno. ⁽⁵⁶⁾. É de supor que o complexo dorsal do vago (CDV) pode estar primariamente envolvido no fenômeno de retarde do EG. O CDV é formado pelo núcleo do trato solitário (NTS) com neurônios que recebem informações da via aferente e pelo núcleo dorsal do vago (NDV) onde estão localizados os motoneurônios estimuladores colinérgicos e os inibitórios não colinérgicos não adrenérgicos da via eferente do nervo vago. ⁽²⁷⁾.

A secção prévia sub-diafragmática dos ramos ventral e dorsal do nervo vago, reduziu significativa a RG nos animais infartados e também nos animais SH. O resultado observado entre os animais sham é esperado, já que este tipo de vagotomia é capaz de aumentar o EG de líquido, por aumento do tônus do estômago proximal ⁽⁵⁷⁾. Entretanto, a redução da %RG pela vagotomia nos animais infartados foi maior (aproximadamente 40%), quando comparadas as reduções entre as médias das %RG entre os dois grupos. A vagotomia modifica a atividade motora do estômago bloqueando a chegada dos estímulos inibitórios aferentes ao trato solitário e abolindo os estímulos eferentes, que se originam no núcleo dorsal do vago ^(9,58,59). As fibras aferentes do nervo vago transmitem informações sensoriais de outras regiões do trato gastrointestinal e as vias eferentes inervam do fundo gástrico ao colon descendente ^(56,60). Assim, com o procedimento empregado neste estudo, não temos condições de saber se estamos bloqueando estímulos aferentes ou eferentes e em que parte do trato gastrointestinal. Entretanto, os resultados sugerem a participação, pelo menos em parte, do nervo vago no retardo de EG induzido pelo infarto de miocárdio.

Após a técnica de vagotomia passaram-se duas semanas antes de realizar o procedimento de infarto simulado por ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, durante esse período os ratos tiveram livre acesso à água com glicose a 10%, como pré-tratamento para evitar o retardo do EG (gastroparesia), a qual se desenvolve quando se lesa os ramos ventral e dorsal do nervo vago.

O cloridrato de prazosina é uma medicação anti-hipertensiva que reduz a pressão arterial através de diferentes efeitos sobre a função simpática. Prazosin atua como antagonista periférico alfa-1 adrenérgico, predominantemente no receptor arteriolar periférico. Esta droga reduz a pressão sanguínea através da não sobreposição dos efeitos anti simpáticos ⁽⁶¹⁾. O fenômeno de retardo EG mostrado tem participação, pelo menos em parte, dos receptores alpha-1 adrenérgicos do sistema nervoso simpático.

A função dos alpha1-adrenoceptores como receptores estimulatórios envolve, particularmente, a contração da musculatura lisa, especialmente a contração das fibras musculares lisas vasculares, determinando vasoconstricção local e atuando no controle da pressão arterial ⁽⁶²⁾. Prazosin é o antagonista periférico que se liga a estes receptores nos vasos ^(61,63) e não tem influência significativa no tônus gástrico ou nas contrações fásicas do estômago ⁽⁶⁴⁾. O tratamento *iv* com prazosin diminuiu significativamente o efeito do infarto do miocárdio sobre o EG. Este fato vai de encontro com o proposto por Camurça *et al* ⁽⁵³⁾, de que o retardo do EG no infarto do miocárdio resultaria do aumento da

atividade simpática e, diante do observado no presente estudo, com a possibilidade de envolvimento do sistema vascular.

Em adição, foi também constatado que nos animais do grupo SH ocorreu redução significativa da RG induzida pelo prazosin. A razão disto é desconhecida. No estudo anterior do nosso laboratório sobre o efeito do infarto do miocárdio sobre o EG ⁽³⁵⁾, constatamos que os animais sham apresentaram aumento da RG, embora não significativa, em relação ao grupo naive. Este fato foi atribuído ao efeito combinado da anestesia+cirurgia, procedimentos realizados vinte quatro horas antes na formação do grupo sham. Este efeito combinado, se verdadeiro no presente estudo, poderia ser menos intenso ao nível vascular do grupo SH do que no grupo INF e explicar os resultados do tratamento com prazosin. De qualquer forma, a redução da RG induzida pelo prazosin foi 77% maior nos animais infartados, sugerindo a participação de alpha1-adrenoceptores nesta condição.

O PVN é a maior região integradora do hipotálamo que atua na manutenção da homeostase. Funcionalmente, o PVN esta envolvido na ingestão de alimento, nas respostas ao stress, modula a taxa metabólica, a termo-regulação e participa da regulação da função cardiovascular e do sistema nervoso autonômico ⁽⁶⁵⁾. Esta estrutura hipotalâmica tem participação na regulação autonômica cardiocirculatória ^(66,67). A insuficiência cardíaca tem sido associada com alterações em áreas no cérebro específicas e as alterações na ativação de neurônios no PVN estão relacionadas com anormalidades na produção de vasopressina, regulação do volume sanguíneo e estimulação (excitation) simpática ⁽⁶⁸⁾.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo em ratos, utilizando como refeição de prova uma solução líquida isotônica e inerte do ponto de vista calórico, para o estudo do esvaziamento gástrico, sugerem:

- 1) Que o infarto recente do miocárdio não induz modificações no tônus gástrico em ratos.
- 2) Existe participação do nervo vago no retardo do EG causado pelo infarto recente do miocárdio.
- 3) O fenômeno de retardo EG mostrado pelos ratos infartados tem participação, pelo menos em parte, dos receptores alpha-1 adrenérgicos do sistema nervos simpático.
- 4) Existe participação do núcleo paraventricular no retardo do EG induzido pelo infarto recente do miocárdio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cooke AR. Control of gastric emptying and motility. *Gastroenterology*. 1975; 68: 804-816.
2. Weisbrodt N. Gastric Emptying. In: Johnson LR. *Gastrintestinal Physiology*. 1997; 5th Edition.
3. Ehrlein HJ, Akkermans LMA. Gastric and Gastroduodenal Motility. *Surg Sci Ser*. 1984; 4:74-84.
4. Azpiroz F. Control of gastric emptying by gastric tone. *Dig Dis Sci*. 1994; 39 (Suppl):18S-19S.
5. Bustorff-Silva J, Perez CA, Fonkalsrud PE, Raybould HE. Gastric emptying fundoplication is dependent on changes in gastric volume and compliance. *Journal of Pediatric Surgery*. 1999; 34:1232-1235.
6. Hunt JN. Mechanisms and Disorders of Gastric Emptying. *Annu Rev Med*. 1983; 34: 219-229.
7. Lent R. O Organismo Sob Controle. In: *Cem bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. 2001; Editora São Paulo, Atheneu: FAPERJ, 452-481.

8. Minami H, Mccallum RW. The Physiology and Pathophysiology of Gastric Emptying in Humans. *Gastroenterology*. 1984; 86: 1592 – 1610.
9. Busks TF, Galligan JJ, Porreca F, Barber WD. Regulation of gastric emptying. *Federation proceedings*. 1985; 44:2897-2901.
10. Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters _ roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20 (Suppl 7): 3-14.
11. Johnson LR. Peptides of gastrointestinal tract. In: Johnson LR, editor. Fifth Edition. *Physiology of Gastrointestinal Tract*. St. Louis: Mosby. 1997; p.1-14.
12. Raybould HE, Glatzle J, Robin C, Meyer JH, Phan T, Wong H et al. Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am J. Physiol*. 2003; 284: G367-G372.
13. Raybould HE. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Op Pharmacol*. 2007; 7:570-574.

14. Raybould HE, Lloyd KCK. Integration of postprandial function in the proximal gastrointestinal tract, Role of CCK and sensory pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 713:143-156.
15. Savastano DM, Covasa M. Intestinal nutrients elicit satiation through concomitant activation of CCK1 and 5HT3 receptors. *Physiol Behav.* 2007; 92:434-442.
16. Tomé D. From gut nutrient sensing to nutrient perception: a cooperative role involving CCK and 5HT3. *Am J Physiol.* 2007; 292: R1061-R1062.
17. Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21:16-19.
18. Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABA_B receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2000; 16: 296 – 312.
19. Johnston GAR. GABAC receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1996; 17:319-323.
20. Mody I, Dekoninck Y, Otis TS, Soltesz I. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci.* 1994; 17: 517-525.

21. Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1993; 33:109 -147.
22. Cryan JF, Kaupmann K. A role for GABAB receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26:36-43.
23. Andrews PLR, Wood KL. Systemic baclofen stimulates gastric motility and secretion via a central action in the rat. *Brit J Pharmacol.* 1986; 89:461-467.
24. Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Central and peripheral action of GABAA and GABAB agonists on small intestine motility in rats. *Eur J Pharmacol.* 1988; 150:163-169.
25. Partosoedarso ER, Young RL, Blackshaw LA. GABAB receptors on vagal afferent pathways: peripheral and central inhibition. *Am J Physiol.* 2001; 280:G658-G668.
26. Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W. A Physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1995; 46:423-462.

27. Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut*. 1999; 45: (suppl II) 6 – 16.
28. Graça JRV, Leal PRL, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. Variations in gastric compliance induced by acute blood volume changes in anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35: 405-410.
29. Conhen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995; 92: 3337 –3349.
30. Fuster V, Lewis AC. Mechanisms leading to myocardial infarction: Insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994; 90: 2126 – 2146.
31. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science*. 1984; 224: 452-459.
32. Rocha B. The effects of stress in normal and adrenalectomized mice. *Eur J Immunol*. 1985; 15: 1131-35.
33. Lenz HJ, Raedler A, Greten H, Vale WW, Rivier JE. Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotrophin-releasing factor. *Gastroenterology*. 1988; 95: 1510-1517.

34. Collares-Buzato CB, Collares EF, Fernandes GA. Effect of paraventricular nucleus lesion and cold restraint stress on gastric emptying of a liquid meal in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1993; 26: 1009 – 1014.
35. Ramirez-Nunez WR, Almeida EA, Ozaki MR, Vinagre AM, Collares EF, Fernandes GA. Vaciamiento gástrico de líquidos en ratas sometidas a infarto del miocardio. *Acta gastroenterol Latinoam.* 2006; 36: 33 – 37.
36. Ballone GJ. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal, In: *PsiquWeb*, Internet. 2003; disponível em <http://www.virtualpsy.org/psicossomatica/hipofise.html>>
37. Pfeiffer MA, Pfeiffer JM, Fisbein MC. Myocardial infarct size and ventricular functions in rats. *Circ Res.* 1979; 44: 503 – 512.
38. Alpert JS, Thygesen K. Myocardial infarction redefined. *Eur Heart J.* 2000; 21: 1502 – 1513.
39. Chianca DA, Bonagamba LG, Machado BH. Neurotransmission of the Bezold-Jarisch reflex in the nucleus tractus solitarii of sino-aortic deafferentated rats. *Brain Res.* 1997; 756: 46 – 51.

40. Gondim FAA, Oliveira GR, Graça JRV, Gondim RBM, Alencar HMP, Dantas RP et al. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. *Neurogastroenterol Motil.* 1999; 11: 93 – 99.
41. Oliveira GR, Gondim FAA, Graça JRV, Xavier-Neto J, Dantas RP, Gondim RBM et al. Acute blood volume expansion delays the gastrointestinal transit of a charcoal meal in awake rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 835 – 840.
42. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998; 339(5): 321 – 328.
43. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med.* 1999; 341(8): 577 – 585.
44. Gondim FAA, Oliveira GR, Graça JRV, Cavalcante DIM, Sousa MAN, Santos AA et al. Variation in gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume changes in awake rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 967-973.
45. Ganguly PK, Dhalla KS, Shao Q, Beamish RE, Dhalla, NS. Differential changes in sympathetic activity in left and right ventricles in congestive heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J.* 1997; 133: 340 – 345.

46. Groot, T. The rat forebrain in stereotaxic coordinates. NV Noord-Holandsch Witgevers, Amsterdam, Netherlands. 1959.
47. Collares EF, Vinagre AM. Effect of the GABAB agonist baclofen on dipyrene-induced delayed gastric emptying in rats. Braz J. Med Biol Res. 2004; 38: 99 – 104.
48. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1998; 4th edn. Academic Press, San Diego.
49. Johns JNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. Annals of Surgery. 1954; 140: p675-680.
50. Belangero VMS, Collares EF. Esvaziamento gástrico e acidose metabólica I, Estudo de um modelo experimental em ratos, empregando uma solução de cloreto de amônio por via orogástrica. Arq Gastroenterol. 1991; 28(4): p145-150.
51. Bucarechi F, Collares EF. Effect of Phoneutria nigriventer spider venom on gastric emptying in rats. Braz J Med Biol Res. 1996; 29: p205-211.

52. Ferreira de Queiroz DA, Camurça FD, Leal PRL, Cavalcanti IC, Rodrigues CL, Freire CCF et al. O infarto do miocárdio inibe o esvaziamento gástrico de líquido em ratos acordados. XVI Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental. Caxambú – MG. 2001.

53. Camurça FD, Ferreira de Queiroz DA, Leal PRL, Rodrigues CL, Gondim FAA, Graça JRV, et al. Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats is delayed after acute myocardial infarction. *Digestive Diseases and Sciences*. 2004; 49: 757 – 762.

54. Malagelada JR, Aspiroz F. Determinants of gastric emptying and intestinal transit. In Wood JW, ed. *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System*. Sect 6, Vol 1. JW Wood (ed). Bethesda, American Physiological Association. 1989; pp. 909 – 937.

55. Danovich BZ, Anisimova NA. Acute distension of the stomach during myocardial infarct. *Kardiologija*. 1967; 7(6): 110 – 111.

56. Berthoud HR, Carlson NR, Powley TL. Topography of efferent vagal innervation of the rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1991; 260: 200 – 207.

57. Kelly KA. Effect of gastric surgery on gastric motility and emptying. In: Akkermans LMA; Johnson AG, Read NW, Editors. Gastric and Gastrointestinal Motility. Surgical Science. Serie 4. New York: Praeger; 1984. p 241-262.
58. Camilleri M, Malagelada JR. Gastric motility in disease. In: Akkermans LMA, Johnson AG, Read NW, Editors. Gastric and Gastrointestinal Motility. Surgical Science. Series 4. New York: Praeger; 1984. p 201-232.
59. McCann MJ & Rogers RC. Impact of antral mechanoreceptor activation on the vago-vagal reflex in the rat: Functional zonation of responses. *J Physiol.* 1992; 453: 401-411.
60. Berthoud H-R. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat Rec.* 2004; 280A:827-835.
61. Guthrie GP, Kotchen TA. Effects of prazosin and clonidine on sympathetic and baroreflex function in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol.* 1983; 23: 348 – 354.
62. Docherty JR. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67:405-417.

63. Lubbe WF, Hodge JV. Combined alpha- and beta- adrenoceptor antagonism with prazosin and oxprenolol in control of severe hypertension in pregnancy. *N Z Med J.* 1981; 94:169-172.
64. Bojö L, Nellgard P, Cassuto J. Effects of selective adrenergic agonists and antagonists on gastric tone in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1991; 142:517-522.
65. Schlenker EH. Integration in PVN: another piece of the puzzle. *Am J Physiol.* 2005; 289: R653-R655.
66. Coote JH. A role for the paraventricular nucleus of hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp Physiol.* 2004; 90:169-173.
67. Pyner S. Neurochemistry of paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat.* 2009; 38: 197-208.
68. Patel KP. Role of paraventricular nucleus in mediating sympathetic outflow in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000; 5:73-86.

8. APÊNDICE

Estudo da Medida da Complacência Gástrica						
Naive		Sham		Infarto		
Nº Animal	Peso (g)	Nº Animal	Peso (g)	Nº Animal	Peso (g)	Área Infarto (%)
R 13	240	R 24	270	R 27	270	58,7
R 15	250	R 35	305	R 30	265	43,0
R 18	242	R 37	300	R 33	305	56,8
R 19	230	R 38	288	R 51	265	42,5
R 20	230	R 40	286	R 52	260	39,1
R 32	260	R 42	290	R 54	258	45,6
R 49	250	R 47	240	R 59	240	45,3
R 56	276	R 53	220	R 62	256	39,5
-	-	R 55	268	R 63	220	59,4

Estudo Vagotomia								
SH + Sh				SH + Inf				
Nº Animal	Peso (g)	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
V 37	260	4,0	37,7	V 42	250	3,8	47,1	50,2
V 49	240	3,6	26,9	V 43	270	4,0	44,5	40,5
V 51	270	4,0	47,9	V 47	250	3,8	49,6	50,5
V 59	240	3,6	41,3	V 54	270	4,0	31,8	49,3
V 68	235	3,6	39,8	V 55	295	4,4	35,8	45,9
V 69	265	4,0	30,3	V 58	260	4,0	54,4	59,9
V 86	270	4,0	40,9	V 60	290	4,4	47,9	40,8
V 89	260	4,0	38,9	V 61	285	4,2	66,9	61,1
V 93	262	4,0	30,4	V 62	315	4,8	50,6	47,4
V 98	290	4,4	32,3	V 76	300	4,4	59,4	58,3
-	-	-	-	V 78	270	4,0	38,4	71,2
-	-	-	-	V 81	285	4,2	49,9	47,9
-	-	-	-	V 82	285	4,2	53,7	43,9
-	-	-	-	V 85	310	4,6	41,1	61,9
-	-	-	-	V 101	262	4,0	49,1	47,3

Vgx + Sh				Vgx + Inf				
Nº Animal	Peso (g)	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
V 23	224	3,4	36,26	V 13	272	4,0	40,1	52,5
V 29	290	4,4	30,7	V 15	236	3,6	19,7	61,8
V 34	230	3,4	21,9	V 27	280	4,2	26,6	56,9
V 90	276	4,0	25,3	V 74	295	4,4	15,4	50,3
V 99	290	4,4	24,1	V 79	255	3,8	16,9	42,6
V 107	270	4,0	19,4	V 91	274	4,0	19,8	42,1
V 121	275	4,0	26,5	V 94	306	4,6	34,6	46,9
V 122	270	4,0	29,1	V 108	260	4,0	43,0	56,5
V 123	290	4,4	21,9	V 117	275	4,0	33,8	51,9
V 124	270	4,0	23,9	V 118	290	4,4	34,5	48,8
-	-	-	-	V 119	280	4,2	29,6	41,9

Estudo do Efeito da injeção Intracerebroventricular de baclofen								
SH + Sal				Inf + Sal				
Nº Animal	Peso (g)	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
IV 9	205	3,0	30,2	IV 16	215	3,2	41,9	48,8
IV 10	205	3,0	42,5	IV 30	190	2,8	42,0	63,1
IV 20	220	3,4	45,0	IV 36	210	3,2	51,0	41,0
IV 52	205	3,0	31,3	IV 46	220	3,4	34,8	65,8
IV 56	225	3,4	41,6	IV 47	230	3,4	38,7	42,9
IV 70	200	3,0	25,4	IV 105	205	3,8	30,7	44,5
IV 112	235	3,6	26,7	IV 122	250	3,8	49,5	42,3
IV 120	262	4,0	24,1	IV 124	246	3,6	41,9	44,9
IV 133	250	3,8	21,7	IV 132	280	4,2	46,4	61,1
-	-	-	-	IV 134	230	3,4	35,5	51,6
-	-	-	-	IV 136	225	3,4	30,2	57,4

SH + Bac				Inf + Bac				
Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
IV 3	216	3,2	24,5	IV 4	210	3,2	22,2	57,3
IV 18	210	3,2	13,7	IV 17	210	3,2	31,3	48,9
IV 35	225	3,4	10,8	IV 27	225	3,4	42,6	42,6
IV 38	215	3,2	7,8	IV 43	210	3,2	38,2	68,6
IV 50	230	3,4	26,2	IV 55	210	3,2	20,5	43,9
IV 54	225	3,4	35,6	IV 65	230	3,4	20,8	67,9
IV 74	235	3,4	15,20	IV 98	235	3,6	10,9	44,4
IV 101	200	3,0	20,0	IV 99	205	3,0	28,8	44,8
IV 102	225	3,4	14,0	IV 126	240	3,6	11,8	51,6
IV 129	210	3,2	7,5	IV 130	210	3,2	33,2	52,4
IV 131	230	3,4	20,5	-	-	-	-	-

Estudo do efeito do Prazosin								
SH + Sal				Inf + Sal				
Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
Hex 8	235	3,6	34,7	Hex 3	245	3,6	57,3	59,6
Pra 23	225	3,4	26,6	Pra 24	220	3,4	39,0	61,6
Pra 25	240	3,6	32,4	Pra 26	225	3,4	36,8	53,1
Pra 27	220	3,4	31,1	Pra 28	235	3,6	43,3	60,1
Pra 36	225	3,4	33,5	Pra 35	225	3,4	44,5	51,8
Pra 45	230	3,4	30,5	Pra 37	220	3,4	43,2	54,5
Pra 46	255	3,4	36,6	Pra 47	235	3,6	45,6	51,6
Pra 48	235	3,6	31,9	Pra 66	265	4,0	36,3	54,3
Pra 63	250	3,8	30,0	Pra 68	250	3,8	28,7	51,1
Pra 65	260	4,0	20,8	Pra 70	220	3,4	46,3	53,7
Pra 67	240	3,6	27,2	-	-	-	-	-

Sh + Pra				Inf + Pra				
Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
Pra 3	240	3,6	18,3	Pra 4	230	3,4	15,9	61,3
Pra 5	235	3,6	14,2	Pra 6	230	3,4	18,8	63,4
Pra 29	240	3,6	15,8	Pra 32	220	3,4	30,4	51,5
Pra 31	255	3,8	21,0	Pra 33	215	3,2	17,3	53,6
Pra 38	255	3,8	25,5	Pra 40	220	3,4	27,4	53,9
Pra 41	220	3,4	26,5	Pra 42	240	3,6	20,3	54,3
Pra 50	225	3,4	16,8	Pra 56	225	3,4	27,5	52,9
Pra 52	240	3,6	29,1	Pra 57	225	3,4	22,8	54,6
Pra 54	245	3,8	34,3	Pra 61	240	3,6	21,9	53,2
Pra 58	240	3,6	18,7	Pra 62	240	3,6	18,2	53,0
Pra 60	235	3,6	28,4	-	-	-	-	-
Pra 69	260	4,0	19,2	-	-	-	-	-

Estudo da Lesão do Núcleo Paraventricular								
SH + Sh				SH + Inf				
Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
PV 16	265	4,0	36,9	PV 19	295	4,0	50,6	51,5
PV 32	310	4,6	36,6	PV 31	290	4,4	48,8	53,6
PV 59	295	4,4	21,9	PV 58	295	4,4	37,9	48,8
PV 71	300	4,6	25,7	PV 76	300	4,6	44,1	53,6
PV 75	276	4,2	25,8	PV 78	290	4,4	39,5	51,2
PV 77	299	4,6	33,0	PV 80	270	4,0	38,0	51,5
PV 79	280	4,2	33,6	PV 179	296	4,4	33,9	52,2
PV 87	320	4,8	29,6	PV 180	273	4,0	34,3	53,1
PV 89	300	4,6	36,7	PV 193	286	4,2	42,7	54,7
PV 94	300	4,6	41,7	PV 196	300	4,6	39,1	51,2
-	-	-	-	PV 204	284	4,2	35,5	52,5
-	-	-	-	PV 206	306	4,6	50,0	51,0

Pvn + Sh				Pvn + Inf				
Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Nº Animal	Peso	Vol. R. P. (ml)	% R. G.	Área Infarto (%)
PV 81	335	5,0	21,5	PV 109	257	3,8	37,2	56,7
PV 118	297	4,4	38,4	PV 115	310	4,6	16,8	57,8
PV 126	289	4,4	32,6	PV 117	264	4,0	31,1	52,5
PV 141	294	4,4	29,3	PV 148	305	4,6	18,8	58,4
PV 144	283	4,2	38,9	PV 152	299	4,4	36,0	54,4
PV 147	294	4,4	26,2	PV 154	269	4,0	22,9	52,5
PV 153	297	4,4	26,5	PV 156	294	4,5	14,9	57,2
PV 157	290	4,4	14,7	PV 163	280	4,2	21,8	54,0

9. ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

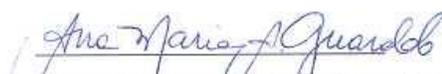
CERTIFICADO

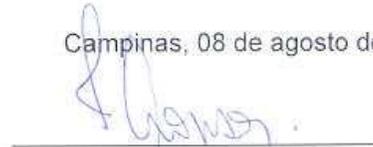
Certificamos que o Protocolo nº 1021-2, sobre "EFEITO DA VAGOTOMIA, SIMPATHECTOMIA, INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE BACLOFEN (AGONISTA DE RECEPTORES GABA_b) E LESÃO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE LÍQUIDOS EM RATOS COM INFARTO RECENTE DO MIOCÁRDIO", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida / Wilson Ranú Ramirez Nuñez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 08 de agosto de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1021-2, entitled "EFFECT OF VAGOTOMY, SYMPATHECTOMY, INTRACEREBROVENTRICULAR INJECTION OF BACLOFEN (GABA_b RECEPTORS AGONIST) AND PARAVENTRICULAR NUCLEUS LESION ON GASTRIC EMPTYING OF A LIQUID MEAL IN RATS AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 08, 2006.

Campinas, 08 de agosto de 2006.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva