

ÂNGELA D'AVILA HARTHMANN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO  
DE PIRIDOSTIGMINA SOBRE A VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA  
CARDÍACA EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 COM NEUROPATIA AUTONÔMICA  
CARDIOVASCULAR**

Tese apresentada como requisito parcial ao  
Programa de Pós Graduação em Ciências da  
Saúde: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares para obtenção do título de  
Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes Filho

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2010.

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo se expondo à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece nem a vitória nem a derrota”.*

*Theodore Roosevelt*

*A todos que superam dificuldades, com esforço e dedicação. Às pessoas que amo e são exemplos disso: meus pais e meu esposo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pelas experiências vividas e a força resultante destas.

Ao meu Orientador, Professor Dr. Ruy Silveira Moraes Filho, pela orientação, dedicação e paciência que me conduziu até o final deste trabalho.

Ao meu esposo, Carlos Alberto de Assis Brasil, pelo incentivo, carinho e amor ao qual me dedica.

Ao meu pai, Elio Arno Harthmann e minha mãe, Neida d'Ávila Harthmann, que sempre transmitiram confiança e orgulho pelos meus projetos. Eles são meus pilares.

Ao meu amigo de longa data, Winston Boff, por ter me auxiliado nos testes de Ewing e ter me ouvido tantas vezes.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, por fazerem parte da minha história.

Aos colegas e amigos do LAFIEX, que me auxiliaram e proporcionaram troca de idéias, principalmente ao Daniel Umpierre, Gaspar Chiappa e Paulo Vieira.

Ao engenheiro Elton Ferlin, pela interpretação dos dados referentes a este trabalho.

À Sirlei, por nos ouvir e apoiar.

Aos funcionários do Serviço de Métodos Não-Invasivos, pela colaboração durante os testes de Inclinação e utilização do aparelho de holter.

Aos pacientes do Ambulatório de Endocrinologia do HCPA, pela disponibilidade, confiança e carinho.

Aos colegas do Centro Universitário Metodista IPA, que me incentivaram nessa caminhada, principalmente ao Emerson Casali, Valesca Casali e Marcia Renner.

À Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo incentivo financeiro, que proporcionou a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<i>Pág</i>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<i>VII</i>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<i>IX</i>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<i>X</i>
<b>Lista de Anexos</b> .....	<i>XI</i>
<b>Resumo</b> .....	<i>XII</i>
<b>Abstract</b> .....	<i>XIII</i>
<b>Capítulo I – Artigo de Revisão</b> .....	<i>1</i>
Introdução.....	<i>1</i>
1.Modulação Autonômica Cardiovascular.....	<i>1</i>
2. Métodos de Avaliação da Modulação Autonômica.....	<i>2</i>
2.1 Testes de Ewing.....	<i>2</i>
2.2 Variabilidade da Freqüência Cardíaca.....	<i>3</i>
2.1.1 Domínio do Tempo.....	<i>3</i>
2.2.2 Domínio da Freqüência.....	<i>4</i>
2.2.3 Mapa de Retorno Tridimensional.....	<i>4</i>
3. Neuropatia Autonômica Diabética.....	<i>5</i>
3.1 Patogênese da Neuropatia Autonômica Diabética.....	<i>6</i>
4. Intervenções que modificam a NAC.....	<i>8</i>
4.1 Drogas Colinérgicas e Neuropatia Autonômica.....	<i>9</i>
Hipótese.....	<i>10</i>
Objetivos Geral.....	<i>10</i>
Objetivos Específico.....	<i>10</i>
Referências Bibliográficas.....	<i>11</i>
<b>Capítulo II – Artigo em Português</b> .....	<i>19</i>
<b>Capítulo III – Artigo em Inglês</b> .....	<i>35</i>
<b>Anexo</b> .....	<i>49</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	= acetilcolina
AF	= alta frequência
BB	= Bio-Breeding
BF	= baixa frequência
BDNF	= fator neurotrófico derivado do cérebro
DM	= diabetes mellitus
DM1	= diabetes mellitus do tipo 1
DM2	= diabetes mellitus do tipo 2
ECA	= enzima conversora de angiotensina
ECG	= eletrocardiograma
FC	= frequência cardíaca
GH	= hormônio do crescimento
ICC	= insuficiência cardíaca congestiva
IMC	= índice de massa corporal
MF	= média frequência
MN	= produto entre $P_1$ , $P_2$ , $P_3$ e $10^{-3}$
MR3	= mapa de retorno tridimensional
NAC	= neuropatia autonômica cardiovascular
NAD	= neuropatia autonômica diabética
NGF	= fator de crescimento neuronal
SNA	= sistema nervoso autônomo
STZ	= estreptozotocina
VFC	= variabilidade da frequência cardíaca
PA	= pressão arterial
PAD	= pressão arterial diastólica
PAS	= pressão arterial sistólica
$P_2$	= dispersão longitudinal máxima
PI	= grupo piridostigmina
PL	= grupo placebo

PNN50 = Percentagem diferenças sucessivas entre intervalos RR que são 50ms.

$P_1$  = inversamente proporcional à declividade no plano que secciona a máxima concentração de pontos

$P_3$  = dispersão transversal máxima

PYR = piridostigmina

RRmed = média de todos os intervalos RR

RMSSD = raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos RR adjacentes elevadas ao quadrado

SDNN = desvio-padrão de todos os intervalos RR normais



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

	<i>Pág</i>
FIGURA 1.....	6

## LISTA DE TABELAS

<b><i>CAPÍTULO I</i></b>	<i>Pág</i>
TABELA 1.....	3
 <b><i>CAPÍTULO II</i></b>	
TABELA 1.....	22
TABELA 2.....	23
TABELA 3.....	23
TABELA 4.....	24
TABELA 5.....	24
TABELA 6.....	25
 <b><i>CAPÍTULO III</i></b>	
TABLE 1.....	22
TABLE 2.....	23
TABLE 3.....	23
TABLE 4.....	24
TABLE 5.....	24
TABLE 6.....	25

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1</b>	Termo de Consentimento Livre e Informado.....	48
----------------	---	----

## RESUMO

**Objetivos/Hipótese:** A Piridostigmina bloqueia a acetilcolinesterase, promove estimulação colinérgica e aumenta a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em indivíduos saudáveis e com insuficiência cardíaca. Os efeitos sobre a modulação autonômica no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) são desconhecidos. Nós testamos a hipótese de que a administração de piridostigmina aumenta a VFC em pacientes com DM2 e neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

**Métodos:** Estudamos 34 pacientes com DM2 e NAC com idade entre 30 e 70 anos. Dezesete receberam 30 mg de piridostigmina via oral, de 8/8h por 24h (PI) e 17 receberam placebo (PL). A VFC foi avaliada pela média (RRMed) e desvio padrão dos intervalos RR (SDNN), pela raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos RR (RMSSD) e pelos índices do Mapa de Retorno Tridimensional  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e MN.

**Resultados:** Não houve diferenças significativas entre os grupos PI e PL quanto às características clínicas basais e à VFC sob efeito de piridostigmina e PL (RRMed -  $748 \pm 99$  vs  $733 \pm 111$ ms; SDNN -  $107 \pm 26$  vs  $108 \pm 36$ ms; RRMSD -  $20,7 \pm 12,7$  vs  $20,3 \pm 10$ ms;  $P_1$  -  $63 \pm 11$  vs  $69 \pm 14$ ;  $P_2$  -  $66 \pm 13$  vs  $63 \pm 15$ ;  $P_3$  -  $86 \pm 34$  vs  $80 \pm 24$  e MN -  $392 \pm 241$  vs  $369 \pm 185$ ).

**Conclusão:** A piridostigmina não modifica a VFC em pacientes com DM2 e NAC.

**Palavras-chaves:** diabetes mellitus, neuropatia autonômica, variabilidade da frequência cardíaca, piridostigmina.

## ABSTRACT

**Aims/Hypothesis:** Pyridostigmine blocks acetylcholinesterase, promotes cholinergic stimulation and increases heart rate variability (HRV) in healthy individuals and with cardiac heart failure. The effects on the autonomic modulation in diabetes mellitus type 2 (DM2) are unknown. We have tested the hypothesis that the administration of pyridostigmine increases HRV in DM2 and CAN patients (CAN).

**Methods:** We have studied 34 DM2 and CAN patients aged between 30 and 70 years old. Seventeen received 30mg of pyridostigmine via oral administration, every 8 hours during 24 hours (PY) and 17 received placebo (PL). HRV was assessed by the mean of all normal R-R intervals RR (mean RR) and the standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN), by the root-mean-square of successive differences (RMSSD) and by the three-dimensional return map indices  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  and MN.

**Results:** There were no significant differences between the PY and PL groups as to the baseline clinical characteristics and to HRV under the effect of pyridostigmine and PL (mean RR -  $748 \pm 99$  vs  $733 \pm 111$ ms; SDNN -  $107 \pm 26$  vs  $108 \pm 36$ ms; RMSSD -  $20,7 \pm 12,7$  vs  $20,3 \pm 10$ ms;  $P_1$  -  $63 \pm 11$  vs  $69 \pm 14$ ;  $P_2$  -  $66 \pm 13$  vs  $63 \pm 15$ ;  $P_3$  -  $86 \pm 34$  vs  $80 \pm 24$  e MN -  $392 \pm 241$  vs  $369 \pm 185$ ).

**Conclusion:** Pyridostigmine does not modify HRV in DM2 and CAN patients.

**Key words:** diabetes mellitus, autonomic neuropathy, heart rate variability, pyridostigmine

## **CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA**

### **INTRODUÇÃO**

A neuropatia é uma das complicações mais freqüentes do diabetes mellitus (DM) e geralmente é acompanhada de várias anormalidades que envolvem o sistema nervoso periférico podendo afetar os componentes do sistema nervoso somático e autonômico. A neuropatia pode provocar dano nas fibras nervosas autonômicas que inervam o coração e os vasos sangüíneos, resultando em anormalidades no controle da freqüência cardíaca e da dinâmica vascular<sup>[1]</sup>. A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) pode apresentar-se como hiperatividade simpática, hipoatividade vagal ou ambas<sup>[2,3]</sup> e sua presença é responsável pela ocorrência de taquicardia sinusal de repouso, intolerância ao exercício, arritmias cardíacas, hipotensão postural sintomática, maior incidência de coronariopatia e aumento de eventos cardiovasculares<sup>[4-7]</sup>.

O mecanismo que explica o aumento de risco devido à disautonomia não está claramente definido, mas existem evidências experimentais de um efeito protetor da estimulação vagal sobre a vulnerabilidade elétrica ventricular correlacionando a hipoatividade parassimpática ao desenvolvimento de arritmias letais<sup>[8,9]</sup>.

Nesta revisão da literatura, abordaremos aspectos básicos da modulação cardiovascular, métodos de avaliação da função autonômica, aspectos clínicos e fisiopatológicos da NAC e as intervenções que podem melhorar a modulação autonômica.

#### **1. Modulação Autonômica Cardiovascular**

O controle cardiovascular é realizado através de uma complexa integração entre mecanismos humorais e mecanismos neurais tanto em nível periférico como central. O sistema nervoso autonômico (SNA), através da ativação e a desativação reflexas do sistema nervoso simpático e parassimpático modula continuamente as características eletrofisiológicas do coração. Durante os vários comportamentos e durante situações emergenciais, ocorrem ajustes no débito cardíaco e na resistência vascular periférica,

contribuindo para a estabilização e manutenção da pressão arterial (PA) ampliando a capacidade do organismo de sobreviver e de se adaptar<sup>[10]</sup>. A frequência cardíaca (FC) também é constantemente submetida a flutuações no tônus autonômico, que responde de forma dinâmica a diferentes estímulos como a respiração, a contração muscular e graus variáveis de estimulação dos barorreceptores arteriais<sup>[11]</sup>.

O comprometimento da modulação autonômica resulta em diminuição dos mecanismos de controle cardiovascular implicando, entre outras coisas, em redução das flutuações da FC batimento a batimento. Essa redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) está associada ao aumento da mortalidade global e cardiovascular e à maior ocorrência de morte súbita pelo desencadeamento de arritmias malignas<sup>[12,13]</sup>. Diversos métodos estão disponíveis para avaliar a presença de disfunção autonômica<sup>[14-16]</sup>, podendo ser divididos em métodos invasivos e não-invasivos<sup>[17]</sup>.

## **2. Métodos de Avaliação da Modulação Autonômica**

### **2.1 Testes de Ewing**

A presença de neuropatia autonômica pode ser avaliada através de testes autonômicos cardiovasculares descritos por Ewing et. al.<sup>[15]</sup>. Os “testes de Ewing” são bastante utilizados e difundidos por ser um método não invasivo, fácil de executar e de baixo custo<sup>[18]</sup>. Para sua realização é necessária a cooperação por parte do paciente. Os testes utilizados avaliam as respostas da FC durante a respiração profunda, manobra de Valsalva e ortostatismo e as respostas da PA frente à mudança voluntária da posição decúbito para ortostática (hipotensão postural) e preensão manual (ou *handgrip*)<sup>[18]</sup>. A presença de NAC pode ser estabelecida quando mais de um teste está alterado<sup>[19]</sup> ou então podem usadas escalas para quantificar a sua gravidade de acordo com a resposta de cada teste. A NAC é classificada em inicial ou grave através de um sistema de pontuação onde cada resultado limítrofe recebe 0,5 ponto e cada resultado anormal recebe 1,0 ponto. Todos os pacientes que apresentarem um escore de 1 a 2,5

são classificados com NAC inicial e com escore de 3 a 5 são classificados com NAC moderada/grave<sup>[18]</sup>.

## **2.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca**

O comportamento da VFC apresenta um padrão circadiano, com aumento durante a noite (por predomínio da modulação vagal) e diminuição durante a vigília (por predomínio da modulação simpática). A análise da VFC permite avaliar a participação do SNA sobre as flutuações da frequência cardíaca, tanto em situações fisiológicas como em intervenções farmacológicas sobre o sistema cardiovascular<sup>[20]</sup>, e tem sido utilizada como um marcador prognóstico independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares<sup>[21,22]</sup>. A VFC pode ser analisada por métodos no domínio da frequência, no domínio do tempo e também por métodos baseados na dinâmica não linear<sup>[16, 17, 23]</sup>.

### **2.2.1 Domínio do Tempo**

A análise da VFC no domínio do tempo é baseada em métodos que calculam a dispersão em torno da média da FC. (Tabela 1). Os índices estatísticos são expressos em valores absolutos (intervalos RR individualmente) ou baseados nas diferenças entre os intervalos RR adjacentes<sup>[24, 16, 18]</sup>. O significado fisiológico dos índices avaliados no domínio do tempo parece estar diretamente relacionado com o tônus vagal, demonstrando uma dificuldade destes índices em detectar atividade simpática ou mesmo balanço simpato-vagal<sup>[20, 25]</sup>.



**Tabela 1** – Definição dos índices da VFC no domínio do tempo.

Índice	Definição
RRMED (ms)	Média de todos os intervalos RR.
SDNN (ms)	Desvio-padrão de todos intervalos RR
SDANNi (ms)	Desvio-padrão dos intervalos RR, medidos em segmentos de 5 min.
SDNNi (ms)	Média dos desvios-padrão dos intervalos RR, medidas em segmentos de 5 min.
RMSSD (ms)	Raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado, entre RR adjacentes.
PNN50 (%)	Percentagem diferenças sucessivas entre intervalos RR que são 50ms.

### 2.2.1 Domínio da Freqüência

Considera-se que a FC apresenta flutuações periódicas e se decompõe o sinal eletrocardiográfico, individualizando e quantificando os diferentes componentes de freqüência de um determinado período. A análise espectral é o método mais utilizado e através dela identificam-se oscilações em três bandas de freqüência. Considerando que, cada banda é influenciada por modulação vagal e/ou simpática, é possível observar a participação do SNA<sup>[18, 24]</sup>.

Independente do método utilizado para cálculo da densidade espectral (transformação rápida de Fourier ou modelo auto-regressivo) são avaliados os componentes de alta freqüência (AF), situados entre 0,15 e 0,5 Hz, que refletem a modulação parassimpática gerada pela respiração e os componentes de baixa freqüência (BF), situados entre 0,04 e 0,15 Hz, que refletem tanto a modulação simpática quanto parassimpática<sup>[20]</sup>. Os componentes da BF e AF são medidos em unidades absolutas de potência (milissegundos ao quadrado por Hz) e a relação da potência de BF para a de AF (BF/AF) pode ser considerada uma medida de equilíbrio simpato-vagal<sup>[18]</sup>.

Para utilizar o método, na análise da modulação simpática é recomendado o uso de estimulação simpática programada, como o ortostatismo passivo e o estresse

mental. A análise espectral é um método dependente da qualidade do sinal eletrocardiográfico, podendo ser fortemente afetado por artefatos e arritmias [18, 20, 24].

### 2.2.3 Mapa de Retorno Tridimensional

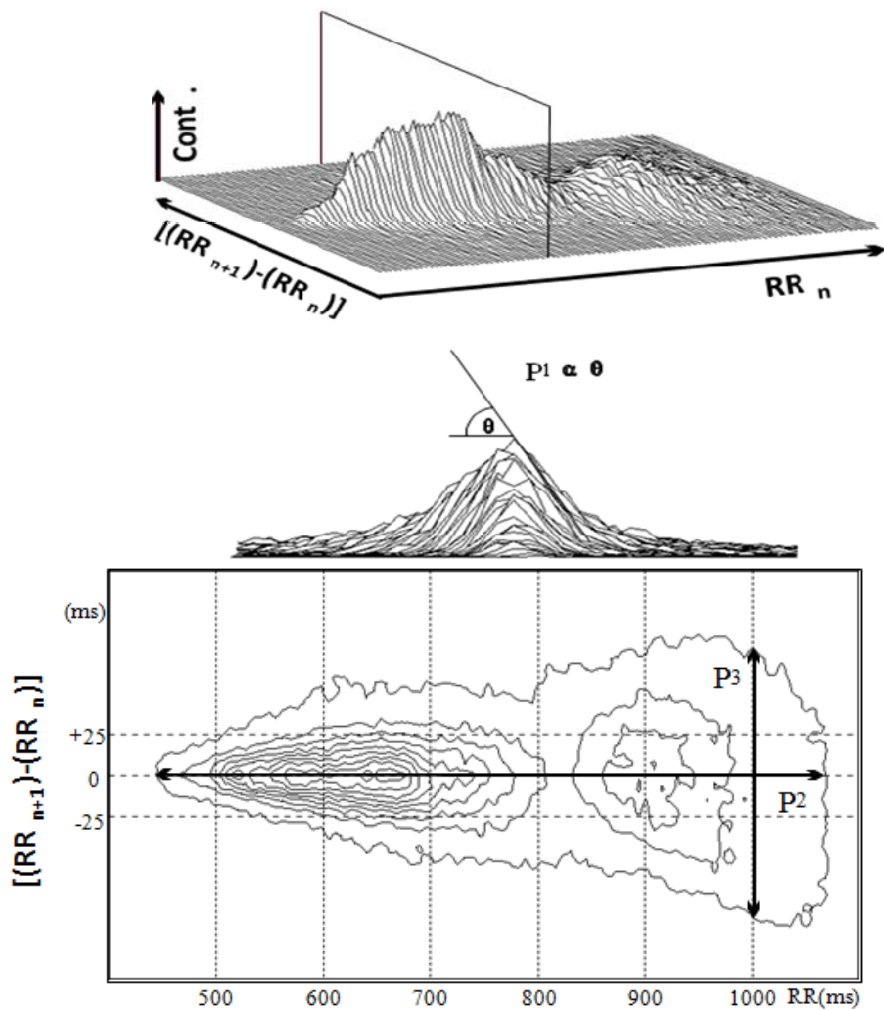
Considerando que uma série temporal de intervalos RR apresenta comportamento não-linear, as avaliações realizadas através dos métodos estatísticos convencionais, como as análises no domínio da frequência e do tempo, podem não refletir todas as características do sistema estudado. Os mapas de retorno são ferramentas que podem ser utilizadas para contemplar a não-linearidade do sistema cardiovascular. O Mapa de Retorno Tridimensional (MR3DD) é construído como  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1}) - RR_n]$  x densidade de ocupação (número de vezes que ocorreu uma mesma diferença sucessiva para um mesmo RR) (Figura 1). Para quantificar as imagens geradas pelo MR3D são utilizados os seguintes índices:  $P_1$  (inversamente proporcional à declividade no plano que secciona a máxima concentração de pontos, calculado a partir da média da curva entre 10 a 90% da densidade máxima);  $P_2$  (dispersão longitudinal máxima);  $P_3$  (dispersão transversal máxima) e MN (produto entre  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e  $10^{-3}$ ). Utilizando bloqueio autonômico com propranolol e atropina, em repouso e durante exercício submáximo, Moraes et. al. demonstraram que os índices do MR3D são capazes de refletir tanto a modulação simpática (índice  $P_1$ ) como a vagal (índices  $P_2$  e  $P_3$ ) e o equilíbrio simpato-vagal (índice MN). Em relação à capacidade de detectar diferentes níveis de disfunção autonômica em pacientes com DM2, os índices do MR3D mostraram ser mais sensíveis e específicos que os índices no domínio do tempo e da frequência [16, 20].

### 3. Neuropatia Autonômica Diabética

A neuropatia autonômica diabética (NAD) é uma das formas de neuropatia diabética e do ponto de vista de morbi-mortalidade do DM tem um papel muito importante, principalmente quando compromete o controle autonômico cardiovascular, causando a NAC. Entre as manifestações clínicas da NAC está a taquicardia de repouso, a intolerância ao exercício, o infarto silencioso do miocárdio e o aumento no risco de mortalidade, afetando as atividades diárias e a qualidade de vida desses

pacientes<sup>[25]</sup>. Em estudo com 100 indivíduos DM tipo 1 e tipo 2 (DM2), Pappachan et. al. <sup>[27]</sup>, evidenciaram 60% de prevalência de NAC e observaram que o aumento da idade, a duração da doença maior que 10 anos e a neuropatia periférica são fatores de risco diretamente associados. Subbalakshmi et. al. <sup>[28]</sup>, avaliaram 207 indivíduos com DM2, demonstrando uma associação entre disfunção parassimpática cardíaca, neuropatia somática e idade. Diversos métodos são utilizados para diagnosticar a disfunção autonômica. <sup>[14-16]</sup> e a falta de padronização intra métodos faz com que a prevalência da NAC possa variar de 17% a 80%, em portadores de DM<sup>[26]</sup>. Avaliações da FC e da PA em pacientes portadores de DM, tanto a estímulos fisiológicos como farmacológicos <sup>[29, 30, 31, 32]</sup> demonstram alterações. Além disso, sabe-se que a VFC está prematuramente reduzida no DM2<sup>[22, 33]</sup>, associada ao desenvolvimento de arritmias letais e morte súbita<sup>[34,35]</sup>.

**Figura 1:** Mapa de retorno tridimensional



### 3.1 Patogênese da Neuropatia Autonômica Diabética

Embora a ocorrência das neuropatias em pacientes com DM tenha sido reconhecida desde 1864<sup>[36]</sup>, sua patogênese ainda não está totalmente esclarecida<sup>[27]</sup>. Os mecanismos propostos para o desenvolvimento da neuropatia são baseados em estudos experimentais e clínicos, sendo que o fator mais significativo está diretamente relacionado com o grau de controle glicêmico. A hiperglicemia, observada principalmente no DM descompensado, aumenta os níveis de glicose intracelular causando alterações metabólicas importantes<sup>[27]</sup>. Os danos aos nervos do sistema nervoso podem causar distúrbios da função motora, sensorial e reflexa, nos sistemas digestivo, urogenital, sudoral e de modo especial no sistema cardiovascular<sup>[37, 38]</sup>.

Entretanto, a impossibilidade de mensurar o tráfego das vias nervosas limita as informações sobre alterações patológicas em nervos autonômicos.

A hiperglicemia observada no DM aumenta as concentrações de glicose intracelular o que pode levar a mudanças metabólicas, ocasionadas pela formação de um elevado número de espécies reativas de oxigênio. Somando isto a um desequilíbrio na formação de anti-oxidantes ocorreria o estresse oxidativo e com a disfunção mitocondrial decorrente, ocorreria a formação de um ciclo vicioso, piorando o quadro e provocando dano em endotélio vascular e neurônios<sup>[39, 40]</sup>.

O aumento dos níveis de glicose no nervo e células endoteliais determina alterações nos níveis de lípidos, polióis, glicosilação não-enzimática das proteínas, ativação de proteína quinase C e disfunção em fatores de crescimento, também resultando em prejuízo da função mitocondrial com resultante apoptose de neurônios e células de Schwann<sup>[39, 41]</sup>.

As Neurotrofinas, como fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 e neurotrofina 4 têm sido sugeridas por ter um efeito protetor em DM e a perda destas, poderia implicar no desenvolvimento de neuropatia sensorial<sup>[40]</sup>. Em estudos *in vitro*, foi observado que o fator de crescimento neuronal causou proteção ao estresse oxidativo e indução na produção de enzimas antioxidantes. Também foram encontrados benefícios na administração de NGF em neurônios sensoriais de ratos diabéticos por estreptozotocina (STZ), mas o sucesso desse tratamento pode não ser confirmado em todas as sub-populações de neurônios periféricos<sup>[42]</sup>.

Do ponto de vista histopatológico, anormalidades anatômicas e funcionais em gânglios simpáticos têm sido observadas tanto animais como humanos com neuropatia autonômica. Ratos espontaneamente diabéticos (Bio-Breeding) e diabéticos por STZ apresentaram alterações degenerativas, caracterizadas por distrofia axonal e alteração morfológica de nervos autonômicos simpáticos e parassimpáticos<sup>[43 - 45]</sup> e o número de lesões foi diretamente relacionado com a progressão da doença<sup>[43]</sup>.

Alterações em dentritos, axônios (distrofia neuroaxonal) e sinapses (displasia sináptica) foram observadas em autópsias realizadas em gânglios simpáticos paravertebral superior cervical e mesentérico pré-vertebral superior de humanos.

Porém, apesar de achados neuropatológicos tão consistentes, os mecanismos patológicos envolvidos e a aplicação de terapias para remodelamento neuronal ainda são incertas<sup>[46]</sup>.

#### **4. Intervenções que modificam a NAC**

Diversas intervenções têm sido utilizadas para melhorar a redução da VFC observada em indivíduos com NAC. Entretanto, sabe-se que em pacientes portadores de DM, o controle glicêmico e o progressivo manejo da hiperglicemia são essenciais, reduzindo em 60% a frequência de neuropatia em DM tipo 1 em um período de 5 anos<sup>[47]</sup>.

Entre os tratamentos não-farmacológicos podemos citar o transplante de pâncreas<sup>[48]</sup> e o exercício físico<sup>[49,50]</sup>, cuja melhora na função autonômica parece estar relacionada às modificações metabólicas que promovem nos pacientes, em médio e longo prazo. No caso do treinamento físico, a melhora na modulação autonômica, avaliada pela VFC, apenas foi demonstrada nos pacientes menos comprometidos, não sendo modificada naqueles com NAC grave<sup>[49]</sup>.

Entre intervenções farmacológicas, tem sido analisado o efeito de drogas que interferem no metabolismo, como anti-oxidantes<sup>[51]</sup> e inibidores da aldose redutase (que interferem na via dos polióis)<sup>[52]</sup> e drogas que possam interferir na modulação simpática como, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA)<sup>[53]</sup> e beta bloqueadores<sup>[54]</sup>.

A redução da atividade simpática através de agentes beta bloqueadores está associada à diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular <sup>[55, 56]</sup> e os mecanismos envolvidos provavelmente também incluem aumento da atividade vagal<sup>[57]</sup>,<sup>58]</sup>. Por isso, estudos têm avaliado os efeitos da ativação colinérgica na VFC de pacientes com disfunção autonômica e têm sido observado efeitos benéficos nesses pacientes<sup>[59 - 62]</sup>.

#### 4.1 Drogas Colinérgicas e Neuropatia Autonômica

O uso de fármacos colinérgicos ou vagomiméticos, que mimetizam a ação parassimpática provocando o efeito similar e mais duradouro que o da Ach, tem sido considerado para promover aumento da modulação vagal<sup>[63, 64]</sup>.

A escopolamina (um agente antimuscarínico que possui efeito vagomimético paradoxal em baixas doses) foi capaz de aumentar a VFC em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC)<sup>[34]</sup> sugerindo que a droga poderia eventualmente conferir cardioproteção nestes pacientes. Porém, Hull et al.<sup>[65]</sup> avaliaram o efeito da escopolamina sobre a VFC e a ocorrência de fibrilação ventricular induzida por exercício e associada à oclusão coronária em cães e observaram que a droga não foi capaz de qualquer proteção contra fibrilação ventricular, apesar de ter aumentado a VFC. Segundo os autores, o aumento da atividade vagal produzido pela escopolamina não foi suficiente para compensar o efeito arritmogênico da hiperatividade adrenérgica, sendo necessário um maior grau de estimulação colinérgica<sup>[65]</sup>. Entretanto, a escopolamina e outros bloqueadores muscarínicos, como a atropina, não poderiam atender esta necessidade por produzirem uma ativação vagal apenas em baixas doses<sup>[63, 64]</sup>.

Uma alternativa farmacológica para provocar estimulação colinérgica é a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase, onde as drogas interagem de forma irreversível ou reversível, inativando esta enzima<sup>[63, 64]</sup>. Drogas como Isoflurato, Paration e Malation e Soman que se ligam à acetilcolinesterase de forma irreversível, podem levar a morte de um indivíduo, pois o excesso de acetilcolina devido a sua não metabolização, gera parada cardiorespiratória<sup>[64]</sup>. Os anticolinesterásicos reversíveis, como a Neostigmina e a Piridostigmina são usados rotineiramente por anestesistas na reversão farmacológica do bloqueio neuromuscular, sendo também empregados em oftalmologia e no tratamento da miastenia grave<sup>[64, 66, 67]</sup>.

A tolerância e os efeitos autonômicos da piridostigmina têm sido investigados em indivíduos saudáveis e em portadores de várias doenças<sup>[59 - 62]</sup>. Estudos realizados em indivíduos normais demonstraram que a piridostigmina é bem tolerada na dose de 30 mg<sup>[68 - 71]</sup>. Nobrega et. al.<sup>[69, 71]</sup> mostraram que a dose oral de 30 mg causa redução média de 14% da atividade da colinesterase sérica em indivíduos saudáveis e é capaz

de produzir estimulação colinérgica, diminuindo a FC de repouso e aumentando a VFC sem interferir na função miocárdica<sup>[62, 70]</sup>. Além disso, aumenta a VFC sem interferir na função miocárdica<sup>[62, 70]</sup>.

Pontes et. al.<sup>[70]</sup>, em análises da VFC em pacientes pós-infarto do miocárdio, observaram que a piridostigmina pode ser utilizada com razoável margem de segurança. Enquanto Behling et. al.<sup>[60]</sup>, utilizando a dose oral de 30 mg em pacientes com ICC encontraram redução de 65% nas arritmias ventriculares e aumento da VFC.

A utilização de piridostigmina parece ser bem tolerada até mesmo por pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2. A dose de 120 mg foi utilizada para avaliar respostas secretoras de hormônio do crescimento em grupos de pacientes diabéticos sem complicações<sup>[72, 73]</sup>, mas não foi avaliado o efeito da droga na atividade cardíaca desses pacientes.

A piridostigmina mostrou ser capaz de aumentar a modulação vagal em indivíduos saudáveis e em pacientes com disfunção autonômica secundária à ICC e ao infarto do miocárdio. Até o presente momento, o seu efeito sobre a modulação autonômica em portadores de DM2 com NAC ainda não foi testada. Devido ao aumento do risco cardiovascular em pacientes com DM2 e NAC, consideramos clinicamente relevante testar o efeito colinérgico da piridostigmina nesses pacientes.

## **5. Hipótese**

A administração oral de piridostigmina aumenta a variabilidade da frequência cardíaca em pacientes diabéticos com neuropatia autonômica cardiovascular.

## **6. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da administração oral de piridostigmina sobre a variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com DM2 e NAC.

### **6.1 Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar o efeito da administração oral de piridostigmina sobre a VFC de 24 horas, através dos índices no domínio do tempo e do mapa de retorno tridimensional.
- 2) Avaliar o efeito da administração oral de piridostigmina sobre a VFC durante o período do dia e da noite, através dos índices no domínio do tempo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vinik AI (1999). Diabetic neuropathy. Pathology and therapy. *Am J Med.* 107: 17S-26S.
2. Moser M, Lehofer M, Sedminek A et al (1994). Heart rate variability as a prognostic tool in cardiology. A contribution to the problem from a theoretical point of view. *Circulation* 90: 1078-82.
3. Puig J, Freitas J, Carvalho MJ et al (1991). Study of the autonomic nervous system with heart rate spectral analysis in acute myocardial infarction. *Rev Port Cardiol* 10: 923-9.
4. Richard MJ, Richard WN (1992). Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 20: 736-744.
5. Furtado MV, Polanczyk CA (2007). Prevenção cardiovascular em pacientes com diabetes: revisão baseada em evidências. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51(2): 312-318.
6. Bloomgardem, ZT (2008). Glycemic Control in Diabetes: A Tale of Three Studies. *Diabetes Care* 31(9): 1913-19.
7. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Briv V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D (2005). Diabetic Neuropathies A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28 (4): 956-62.
8. Vanoli E, Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull SS, Foreman RD, Schwartz PJ (1991). Vagal stimulation and sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. *Circ Res.* 68: 1471-81.
9. Kolman B, Verrier R, Lown B (1975). The effect of vagus nerve stimulation upon vulnerability of the canine ventricle: role of sympathetic-parasympathetic interactions. *Circulation*; 52: 578.
10. Cowley Jr. AC., Franchini KG (1996). Autonomic control of blood vessels. In: Robertson D., ed. *Primer on the Autonomic Nervous System.* San Diego, CA: Academic Press Inc; 49-55.
11. Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Bastos BG (1996). Resting and reflex heart rate responses during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. *Brazilian J Med. Biol. Res.* 29:1461-1465.
12. Schwartz PJ (1987). The quest for mechanisms of the sudden infant death syndrome: doubts and progress. *Circulation* 75: 677-683.

13. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability (1996). Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 17: 354-81.
14. Ewing, D.J., Campbell IW., Clarke BF (1991). Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients. *Diabetologia* 34: 182-5.
15. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF (1985). The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care* 8: 491-498.
16. Moraes RS, Ferlin EL, Polanczyk CA, Rohde LE, Zaslavski L, Gross JL, Ribeiro JP (2000). Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. *Auton Neurosci* 83:90-9.
17. De Angelis K, Santos MSB, Irigoyen MC (2004). Sistema Nervoso Autônomo e Doença Cardiovascular. *Rev Soc Cardiol RGS* 3: 1-7.
18. Moffa PJ e Sanches PC (2001). Variabilidade da Frequência Cardíaca Conceito e Utilidade Clínica In: Ed. Roca LTDA. *Tranches Eletrocardiograma Normal e Patológico*. São Paulo, SP: 839-869.
19. Zaslavsky, LMA, Gross JL, Chaves ML, Machado R (1995). Memory dysfunction and autonomic neuropathy in non-insulin-dependent (type 2) diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 30: 101-110.
20. Ribeiro JP, Moraes RSF (2005). Variabilidade da frequência cardíaca como instrumento de investigação do sistema nervoso autônomo em condições fisiológicas e patológicas. *Rev. Bras. Hipertens* 12(1): 14-20.
21. Pizzi C, Manzoli L, Mancini S and Costa GM (2008). Analysis of potential predictors of depression among coronary heart disease risk factors including heart rate variability, markers of inflammation, and endothelial function. *Europ Heart J.* 29: 1110–1117
22. Schroeder BH, Chambles LE, Liao D, Prineas RJ, Evans GW, Rosamond WD, Heiss G (2005). Diabetes, Glucose, Insulin, and Heart Rate Variability. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care* 28: 668–674.
23. Freeman R (1991). Spectral analysis of heart rate in diabetic autonomic neuropathy: A comparison with standard tests of autonomic function. *Arch Neurol.* 48(2):185-90.
24. Castro CLB, Nóbrega ACL, Araújo CGS (1992). Testes Autonômicos Cardiovasculares. Uma Revisão Crítica. Parte II. *Arq Bras Cardiol* 59 (2): 151-158.

25. Polanczyk CA, Rohde LE, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP (1998). Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol.* 79: 69-73.
26. Vinik AI, Maser RE, Braxton MD, Freeman R (2003). Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Care* 26:1553-1579.
27. Pappachan JM, Sebastian J, Bino BC, Jayaprakash K, Vijayakumar K, Sujathan P, Adinegara LA (2008). Cardiac autonomic neuropathy in diabetes mellitus: prevalence, risk factors and utility of corrected QT interval in the ECG for its diagnosis. *Postgrad Med J.* 84(990): 205-10.
28. Subbalakshmi N K, Adhikari P M R, Rajeev A, Asha K, Jeganathan P S (2008). Independent predictors of cardiac parasympathetic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J* 49 (2): 121- 128.
29. Jackson CV, Carrier GO (1983). Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 5: 260-265.
30. Chang KSK and Lund DD (1986). Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 18 (6): 617-624.
31. Hebden RA, Bennett T, Gardiner SM (1987). Pressor sensitivities to vasopressin, angiotensin II, or methoxamine in diabetic rats. *Am J Physiol.* 253(5 Pt 2): R726-34.
32. Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T (1992). Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacology Reviews.* 44(1): 103-180.
33. Pagani M, Malfatto G, Pierini S, Casati R, Masu AM, Poli M, Guzzetti S, Lombardi F, Cerutti S, Malliani A (1988). Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. *J. Auton. Nerv. Syst.* 23: 143-153.
34. La Rovere MT, Mortara A, Pantaleo P, Maestri R, Cobelli F, Tavazzi L (1994). Scopolamine improves autonomic balance in advanced congestive heart failure. *Circulation* 90: 838-843.

35. Oberhauser V, Schwertfeger E, Rutz T, Beyersdorf F, Rump LC (2001). Acetylcholine release in human heart atrium Influence of muscarinic autoreceptors, diabetes and age. *Circulation*.103:1638-1643.
36. Hilsted J (1982). Pathophysiology in diabetic autonomic neuropathy: Cardiovascular, hormonal, and metabolic studies. Review. *Diabetes* 31(8 Pt 1): 730-7.
37. Tseng, KH (2006). Standards of medical care in diabetes-2006: response to the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 29: 2563-4; 2564-5.
38. Sampson MJ, Wilson S, Karagiannis P, Edmonds M, Watkins PJ (1990). Progression of diabetic autonomic neuropathy over a decade in insulin-dependent diabetics. *Q J Med* 75: 635-46.
39. Schmid H (2007). Impacto Cardiovascular da Neuropatia Autonômica do Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51 (2): 232-243.
40. Lincoln J, Shotton HR (2008). Diabetic Autonomic Neuropathy. *Tzu Chi Med J* 20 (3): 161-168.
41. Simmons Z, Feldman EL (2002). Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 15(5): 595-603.
42. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Parvin CA, Escandon E (2001). Effect of NGF and neurotrophin-3 treatment on experimental diabetic autonomic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60(3): 263-73.
43. Schmidt RE, Scharp DW (1982). Axonal dystrophy in experimental diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes* 31(9): 761-70.
44. Yagihashi, S and Sima, AAF (1985). Diabetic autonomic neuropathy the distribution of structural changes in sympathetic nerves of the BB rat. *Am J Pathol* 121:138-147.
45. Yagihashi S e Sima AA (1986). Diabetic autonomic neuropathy in BB rat. Ultrastructural and morphometric changes in parasympathetic nerves. *Diabetes* 35: 733-43.
46. Schmidt RE (2002). Neuropathology and pathogenesis of diabetic autonomic neuropathy. *Int Rev Neurobiol*. 50: 257-92.
47. Vinik A, Mehrabyan A (2004). Diabetic neuropathies. *Med Clin N Am* 88: 947–999.
48. Hathaway DK, Wicks MN, Cashion AK, Cowan PA, Milstead EJ, Gaber AO (1999). Heart rate variability and quality of life following kidney and pancreas–kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* 31: 643–644.

49. Howorka K, Pumpřla J, Haber P, Koller-Strametz J, Mondrzyk J, Schabmann A (1997). Effects of physical training on heart rate variability in diabetic patients with various degrees of cardiovascular autonomic neuropathy. *Cardiovasc Res* 34(1): 206-214.
50. Loimaala A, Huikuri HV, Kõõbi T, Rinne M, Nenonen A, Vuori I (2003). Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(7):1837-42.
51. Pazdro R, Burgess JR (2010). The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev.*20: in press.
52. Ikeda T, Iwata K, Tanaka Y (1999). Long-term effect of epalrestat on cardiac autonomic neuropathy in subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 43 (3): 193-198.
53. Kontopoulos AG, Athyros VG, Didangelos TP, Papageorgiou AA, Avramidis MJ, Mayroudi MC, Karamitsos DT (1997). Effect of chronic quinapril administration on heart rate variability in patients with diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 20(3): 355-61.
54. Ebbehøj E, Poulsen PL, Hansen KW, Knudsen ST, Molgaard H, Mogensen CE (2002). Effects on heart rate variability of metoprolol supplementary to ongoing ACE-inhibitor treatment in type 1 diabetic patients with abnormal albuminuria. *Diabetologia* 45: 965–975.
55. Gheorghide M, Shivkumar K, Schultz L, Jafri S, Tilley B, Goldstein S. Prognostic significance of electrocardiographic persistent ST depression in patients with their first myocardial infarction in the placebo arm of the Beta-Blocker Heart. *Attack Trial Am Heart J.* 126(2): 271-8.
56. Lichstein E, Morganroth J, Harrist R, Hubble E (1983). Effect of propranolol on ventricular arrhythmia. The beta-blocker heart attack trial experience. Pt2. *Circulation* 67: 15-10.
57. Goldsmith RL, Bigger JT, Bloomfield DM, Krum H, Steinman RC, Sackner-Bernstein, Packer M (1997). Long-term carvedilol therapy increases parasympathetic nervous system activity in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 80(15):1101-1104.
58. Binkley PF, Haas GJ, Starling RC, Nunziata E, Hatton PA, Leier CV, Cody RJ (1993). Sustained augmentation of parasympathetic tone with angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 21: 655-661.

59. Singer, W; Opfer-Gehrking, TL; McPhee, BR; Hilz, MJ; Bharucha, AE and Low, PA (2003). Acetylcholinesterase inhibition: a novel approach in the treatment of neurogenic orthostatic hypotension. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*; 74:1294-1298.
60. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nobrega AC, Ribeiro JP (2003). Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J*; 146(3): 494-500.
61. Serra SM, Costa RV, Teixeira De Castro RR, Xavier SS, Nóbrega AC (2009). Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J Card Fail*. 15(2): 124-9.
62. Reis AF, Bastos BG, Mesquita ET, Romêo F<sup>o</sup> LJM, Nóbrega ACL (1998). Disfunção Parassimpática, variabilidade da frequência cardíaca e estimulação colinérgica após infarto agudo do miocárdio. *Arch Bras Cardiol*; 70(3):193-199.
63. Stoelting, RK (1999). Anticholinesterase drugs and cholinergic agonists. In: *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. 3th ed. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, NY.
64. Taylor, P. Cholinergic agonists. In: Gilman, A.G., A.C. Goodman, T.W. Wall, F. Murad, eds. *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th ed. New York, NY: Macmillan, 1985:100-109 (A).
65. Hull SS Jr, Vanoli E, Adamson PB, De Ferrari GM, Foreman RD, Schwartz PJ (1995). Do increases in markers of vagal activity imply protection from sudden death? The case of scopolamine. *Circulation* 15; 91(10): 2516-9.
66. Stein, RD; Backman, SB; Collier, B; Polosa, C (1997). Bradycardia produced by pyridostigmine and physostigmine. *Can J Anaesth* 44 (12): 1286-1292.
67. Arsura EL, Brunner NG, Namba T, Grob D (1987). Adverse cardiovascular effects of anticholinesterase medications. *Am J Med Sci*. 293(1):18-23.
68. Borland R (1985). Studies on the possible central and peripheral effects in man in man of a cholinesterase inhibitor (pyridostigmine). *Hum Toxicol* 4: 293-300.
69. Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Bastos BG (1996). Resting and reflex heart rate responses during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. *Brazilian J Med Biol Res* 29:1461-1465.

70. Pontes PV, Bastos BG, Romêo LJMF, Mesquita ET, Nóbrega ACL (1999). Estimulação colinérgica com piridoestigmina. Análise hemodinâmica e ecocardiográfica em indivíduos normais. *Arq Bras Cardiol* 72(3): 297-301.
71. Nóbrega AC, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP (2001). Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res*. 11(1): 11-17.
72. Martina V, Bruno G, Tagliabue M, Maccario M, Bertaina S, Zumpano E, Arvat E, Ghigo E, Camanni F (1997). Repeated administration of growth hormone-releasing hormone with or without previous administration of pyridostigmine in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*; 29(4):180-3 (abstract).
73. Giustina A, Bresciani E, Tassi C, Girelli A, Valentini U (1994). Effect of pyridostigmine on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in lean and obese type II Diabetic patients. *Metabolism*. 43(7): 893-8.

ÂNGELA D'AVILA HARTHMANN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO  
DE PIRIDOSTIGMINA SOBRE A VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA  
CARDÍACA EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 COM NEUROPATIA AUTONÔMICA  
CARDIOVASCULAR**

Tese apresentada como requisito parcial ao  
Programa de Pós Graduação em Ciências da  
Saúde: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares para obtenção do título de  
Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Silveira Moraes Filho

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2010.



## RESUMO

**Objetivos/Hipótese:** A Piridostigmina bloqueia a acetilcolinesterase, promove estimulação colinérgica e aumenta a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em indivíduos saudáveis e com insuficiência cardíaca. Os efeitos sobre a modulação autonômica no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) são desconhecidos. Nós testamos a hipótese de que a administração de piridostigmina aumenta a VFC em pacientes com DM2 e neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

**Métodos:** Estudamos 34 pacientes com DM2 e NAC com idade entre 30 e 70 anos. Dezesete receberam 30 mg de piridostigmina via oral, de 8/8h por 24h (PI) e 17 receberam placebo (PL). A VFC foi avaliada pela média (RRMed) e desvio padrão dos intervalos RR (SDNN), pela raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos RR (RMSSD) e pelos índices do Mapa de Retorno Tridimensional  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e MN.

**Resultados:** Não houve diferenças significativas entre os grupos PI e PL quanto às características clínicas basais e à VFC sob efeito de piridostigmina e PL (RRMed -  $748 \pm 99$  vs  $733 \pm 111$ ms; SDNN -  $107 \pm 26$  vs  $108 \pm 36$ ms; RRMSD -  $20,7 \pm 12,7$  vs  $20,3 \pm 10$ ms;  $P_1$  -  $63 \pm 11$  vs  $69 \pm 14$ ;  $P_2$  -  $66 \pm 13$  vs  $63 \pm 15$ ;  $P_3$  -  $86 \pm 34$  vs  $80 \pm 24$  e MN -  $392 \pm 241$  vs  $369 \pm 185$ ).

**Conclusão:** A piridostigmina não modifica a VFC em pacientes com DM2 e NAC.

**Palavras-chaves:** diabetes mellitus, neuropatia autonômica, variabilidade da frequência cardíaca, piridostigmina.

## ABSTRACT

**Aims/Hypothesis:** Pyridostigmine blocks acetylcholinesterase, promotes cholinergic stimulation and increases heart rate variability (HRV) in healthy individuals and with cardiac heart failure. The effects on the autonomic modulation in diabetes mellitus type 2 (DM2) are unknown. We have tested the hypothesis that the administration of pyridostigmine increases HRV in DM2 and CAN patients (CAN).

**Methods:** We have studied 34 DM2 and CAN patients aged between 30 and 70 years old. Seventeen received 30mg of pyridostigmine via oral administration, every 8 hours during 24 hours (PY) and 17 received placebo (PL). HRV was assessed by the mean of all normal R-R intervals RR (mean RR) and the standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN), by the root-mean-square of successive differences (RMSSD) and by the three-dimensional return map indices  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  and MN.

**Results:** There were no significant differences between the PY and PL groups as to the baseline clinical characteristics and to HRV under the effect of pyridostigmine and PL (mean RR -  $748 \pm 99$  vs  $733 \pm 111$ ms; SDNN -  $107 \pm 26$  vs  $108 \pm 36$ ms; RRMSD -  $20,7 \pm 12,7$  vs  $20,3 \pm 10$ ms;  $P_1$  -  $63 \pm 11$  vs  $69 \pm 14$ ;  $P_2$  -  $66 \pm 13$  vs  $63 \pm 15$ ;  $P_3$  -  $86 \pm 34$  vs  $80 \pm 24$  e MN -  $392 \pm 241$  vs  $369 \pm 185$ ).

**Conclusion:** Pyridostigmine does not modify HRV in DM2 and CAN patients.

**Key words:** diabetes mellitus, autonomic neuropathy, heart rate variability, pyridostigmine

## **CAPÍTULO II – ARTIGO ORIGINAL**

### **INTRODUÇÃO**

A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) é considerada uma das mais sérias complicações do diabetes mellitus (DM), sendo encontrada em 1/4 dos pacientes portadores de DM tipo 1 e em 1/3 dos portadores de DM tipo 2 (DM2) [1]. A disfunção autonômica observada nesses pacientes pode aumentar a mortalidade em 53% em 5 anos [2] e está relacionada com a maior ocorrência de isquemia miocárdica silenciosa, arritmias ventriculares graves e morte súbita [3,4]. A NAC se manifesta por diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e está prematuramente reduzida no DM2 [5]. Entretanto, algumas intervenções parecem melhorar a modulação autonômica desses indivíduos, como o adequado controle glicêmico [6], o uso de drogas [7], o exercício físico [8] e o transplante de pâncreas [9].

A administração de Brometo de Piridostigmina, um bloqueador da acetilcolinesterase, promove estimulação colinérgica impedindo a hidrólise da acetilcolina (ACh) e aumentando sua disponibilidade nos sítios de ação [10]. Esta droga, utilizada clinicamente na miastenia grave, aumenta a modulação vagal em indivíduos saudáveis [11], em hipertensos [12], na insuficiência cardíaca (ICC) [13] e na hipotensão ortostática [14] resultando em aumento da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

Em pacientes portadores de DM, a piridostigmina já foi utilizada para avaliar respostas secretoras do hormônio do crescimento [15, 16], mas os efeitos sobre a modulação autonômica ainda são desconhecidos. A possibilidade de a piridostigmina tornar-se uma alternativa farmacológica no tratamento de pacientes com disfunção autonômica foi a base para a condução do presente estudo, onde nós testamos a hipótese de que a administração a curto prazo de piridostigmina aumenta a modulação vagal em pacientes com DM2 e NAC.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### **Amostra**

Foram recrutados trinta e quatro (34) pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 [17] com diagnóstico de neuropatia autonômica estabelecido pela presença de testes autonômicos alterados. Os pacientes foram avaliados por história clínica e eletrocardiograma de repouso e foram excluídos os pacientes com idade menor que 18 anos e maior que 70 anos, infarto agudo do miocárdio prévio, disfunção da tireóide, doença pulmonar obstrutiva crônica ou asma brônquica, distúrbios do ritmo cardíaco, etilismo ou tabagismo ativo nos últimos 6 meses, gestantes e hipersensibilidade conhecida ao brometo de piridostigmina. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi obtido de cada indivíduo (Anexo 1).

### **Delineamento**

Este é um ensaio clínico randomizado, duplo-cego controlado por placebo. Após a avaliação inicial, 34 pacientes foram randomizados em dois grupos, sendo 17 indivíduos no grupo Piridostigmina (PI) e 17 indivíduos no grupo placebo (PL).

### **Protocolo**

Cada paciente fez três visitas ao laboratório e as medicações em uso não foram suspensas durante o estudo.

Na primeira visita, os pacientes foram submetidos aos testes autonômicos padronizados por Ewing et. al. [18], para verificação da presença de neuropatia autonômica cardiovascular. Na segunda visita, foi instalado um gravador de Holter (SEER Light digital recorder; GE Medical Systems Information Technologies, Milwaukee, WI, USA) para a gravação de eletrocardiograma (ECG) de 24 horas que foi retirado no dia seguinte. Na terceira visita, os pacientes retornaram ao hospital, onde foram avaliadas a frequência cardíaca e a pressão arterial em repouso e iniciada uma nova gravação do ECG de 24 horas. Os pacientes iniciaram a administração de 30 mg de Brometo de Piridostigmina (Mestinon, ICN, Brasil) ou placebo por via oral, de 8 em 8 horas e para observar eventuais efeitos colaterais, eles permaneceram em observação

no hospital por 2 horas. Os pacientes e os pesquisadores eram cegos quanto à droga utilizada pelos pacientes (placebo ou droga ativa). A FC e PA foram avaliadas na 2º e 3º visita, em repouso, na posição ortostática.

### **Avaliação da Função Autonômica Cardiovascular**

A presença de NAC foi diagnosticada por uma bateria de cinco (5) testes autonômicos cardiovasculares descritos por Ewing et. al. [18]. Para graduar a gravidade da disfunção autonômica foi usada uma escala para categorizar os resultados dos testes. Para cada teste anormal era dado 1 ponto e para cada teste limítrofe era dado ½ ponto, totalizando 5 pontos. Os pacientes foram divididos nas seguintes categorias de pontuação, de acordo com o seu escore: sem NAC (0 - 0,5); NAC inicial (1 - 2,5); NAC moderado/grave (3 - 5).

Foram avaliadas a resposta da FC (eletrocardiograma Cardiofax Ecaps 12 – Nihon Kohden) durante inspiração profunda (valores normais >15), durante manobra de Valsalva (valores normais >1.2) e ao assumir a posição ortostática (valores normais >1.04). E a resposta da pressão arterial (avaliada através de monitor de sinais vitais Critikon, Dinamap™ 1846sx) ao assumir a posição ortostática (valores normais <10mmHg) e durante preensão manual (valores normais >16mmHg).

### **Variabilidade da Frequência Cardíaca**

Durante a gravação do ECG de 24h, os pacientes foram instruídos a evitar exercício físico intenso e preencheram um diário com suas atividades, horários de sono e de despertar e sintomas. A medicação usual não foi suspensa durante a gravação.

Foram calculados os seguintes índices no domínio do tempo: média dos intervalos RR normais (RRmed); desvio padrão dos intervalos RR normais (SDNN); raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado entre intervalos RR adjacentes (RMSSD). A VFC no domínio do tempo foi calculada durante as 24 horas de gravação e em turnos separados (dia e noite), onde foi considerando “noite”, o período das 23 horas até 7 horas.

O Mapa de Retorno Tridimensional foi construído a partir da série temporal de intervalos RR normais, plotando  $RR_n$  (intervalos RR que ocorrerem no período

estudado) versus a diferença entre intervalos RR  $[(RR_{n+1}) - RR_n]$  x densidade de ocupação (número de vezes que ocorreu uma mesma diferença sucessiva para um mesmo RR). A densidade de ocupação foi calculada para cada faixa de 7,2ms e representada na terceira dimensão onde, os intervalos RR que ocorrem durante o período de tempo analisado foram calculados pela diferença entre o eixo x e os intervalos adjacentes de RR no eixo y. Os índices para quantificar o mapa de retorno tridimensional foram os seguintes:  $P_1$  (inversamente proporcional à declividade no plano que secciona a máxima concentração de pontos), que representa a inclinação do pico de maior concentração de pontos;  $P_2$  (dispersão longitudinal máxima), que representa o comprimento longitudinal do cometa;  $P_3$  (dispersão transversal máxima), que representa a largura do cometa no pico de maior concentração de pontos; MN (produto entre  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e  $10^{-3}$ ), que representa o produto dos quatro índices parciais.

A análise dos ECG de 24 h foram realizadas através de um analisador MARS 8000 (GE, Milwaukee, WI, EUA). Todas as gravações foram analisadas por um investigador cegado para o estudo.

### **Análise Estatística**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou conforme indicado. Características clínicas entre os grupos foram comparadas por teste t de Student para variáveis contínuas e teste de qui quadrado de Pearson para variáveis categóricas. Para comparação das intervenções pelos grupos PL e PI, foi utilizado análise de variância para medidas repetidas para comparação das variáveis (interação tempo x grupo). Os dados foram analisados no software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 14.0 para Windows e o nível de significância adotado foi de  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### Características da Amostra

Foram randomizados 38 pacientes para os grupos PI e PL, dos quais, quatro abandonaram o estudo. Na Tabela 1, estão descritas as características clínicas dos 34 pacientes que completaram o estudo. Os dois grupos estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto às características descritas. Dos 34 pacientes, 32 apresentavam hipertensão arterial sistêmica.

**Tabela 1:** Características clínicas da amostra

	PI (n=17)	PL (n=17)
Idade (anos)	59 ± 8	56 ± 11
Sexo F/M	9/8	8/9
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	29,2 ± 4,1	28 ± 3
Tempo DM (anos)	11,3 ± 8	11 ± 7,3
<b>Ewing, n (%)</b>		
NAC inicial	7 (41,1)	11 (64,7)
NAC moderado/grave	10 (58,9)	6 (35,3)
<b>Medicações, n (%)</b>		
Insulina NPH	6 (35,3)	6 (35,3)
Metformina	11 (64,7)	11 (64,7)
Sulfinoréias	3 (17,6)	3 (17,6)
Inibidor da ECA	11 (64,7)	10 (58,8)
Estatinas	3 (17,6)	3 (17,6)
Ácido acetil salicílico	10 (58,8)	7 (41,2)
Bloqueador canal Ca	3 (17,6)	3 (17,6)
Diuréticos	7 (41,2)	10 (58,8)
Beta Bloqueador	3 (17,6)	5 (33,2)

Valores expressos em média ± desvio padrão. ECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina.

## Respostas da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) avaliadas em repouso, realizado antes (pré) e após (pós) utilização de droga/placebo estão descritas na tabela 2. As medidas não apresentaram diferenças significativas, antes e após utilização de droga/placebo.

**Tabela 2:** Pressão arterial sistêmica antes e após PI/PL.

	PI (n=17)		PL (n=17)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
PAS Repouso	145 ± 19	131 ± 17	144 ± 27	138 ± 24
PAD Repouso	79 ± 11	74 ± 10	83 ± 13	79 ± 14

ANOVA para medidas repetidas. Valores representados por médias ± desvio padrão. PRÉ: antes do uso de droga/placebo; PÓS: 24 horas utilizando droga/placebo.

## Modulação Autonômica

### Variabilidade da Frequência Cardíaca

A análise do ECG de 24h revelou um número de ectopias inferior a 1% do total de batimentos analisados. Na Tabela 3, estão descritos os valores dos índices da VFC no domínio do tempo durante as 24 horas de gravação. As análises intra-grupos e inter-grupos não apresentaram diferenças significativas. Nas tabelas 4 e 5, respectivamente, estão os resultados dos índices da VFC no domínio do tempo encontrados durante os períodos do dia e da noite. Os grupos PI e PL não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si, tanto de dia quanto à noite. Na análise intra-grupo, a piridostigmina promoveu pequeno, mas significativo aumento no RRMed durante o dia.



**Tabela 3:** VFC no domínio do tempo em **24horas**

	PI (n=17)		PL (n=17)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
RRMed	727 ± 74	748 ± 99	733 ± 104	733 ± 111
SDNN	100 ± 28	107 ± 26	104 ± 40	108 ± 36
RMSSD	19 ± 9,5	21 ± 13	19 ± 9,3	20 ± 10

ANOVA para medidas repetidas. Valores representados por médias ± desvio padrão. PRÉ: antes do uso de droga/placebo; PÓS: 24 horas utilizando droga/placebo.

**Tabela 4:** VFC no domínio do tempo durante o **DIA**.

	PI (n=17)		PL (n=17)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
RRMed	685 ± 72	708,5 ± 100*	708 ± 113	688 ± 120
SDNN	53 ± 15	56 ± 15	54 ± 20	56 ± 22
RMSSD	17 ± 8,8	18 ± 13	17 ± 8,7	19 ± 11

ANOVA para medidas repetidas. Valores representados por médias ± desvio padrão. PRÉ: antes do uso de droga/placebo; PÓS: 24 horas utilizando droga/placebo.

\*P = 0,014 para grupo PI e efeitos de interação.

**Tabela 5:** VFC no domínio do tempo durante a **NOITE**.

	PI (n=17)		PL (n=17)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
RRMed	801 ± 102	844 ± 107	806 ± 127	822 ± 102
SDNN	55 ± 18	61,5 ± 17	57 ± 23	56 ± 24
RMSSD	21,5 ± 12	22 ± 13	22 ± 12	22 ± 10

ANOVA para medidas repetidas. Valores representados por médias ± desvio padrão. PRÉ: antes do uso de droga/placebo; PÓS: 24 horas utilizando droga/placebo.

### Mapa de retorno tridimensional

As variáveis estudadas em relação ao mapa de retorno tridimensional estão descritas em detalhe na Tabela 6. Os índices parciais P1, P2, P3 e o índice global MN não apresentaram diferenças significativas, quando realizadas comparações intra e inter-grupos.

**Tabela 6:** Índices do Mapa de Retorno Tridimensional

	PI (n=17)		PL (n=17)	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
P1	61 ± 10	63 ± 11	63 ± 12	69 ± 14
P2	65 ± 16	66 ± 13	61 ± 15,5	63 ± 15
P3	89 ± 34	86 ± 34	79 ± 15,5	80 ± 24
MN	375 ± 211	392 ± 241	324 ± 197	369 ± 185

ANOVA para medidas repetidas. Valores representados por médias ± desvio padrão. PRÉ: antes do uso de droga/placebo; PÓS: 24 horas utilizando droga/placebo.

### DISCUSSÃO

Neste ensaio clínico randomizado placebo controlado, foi avaliado pela primeira vez o efeito da estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina em pacientes portadores de DM2 com NAC utilizando um método bastante eficaz e sensível, o MR3D. Este é o primeiro ensaio clínico paralelo utilizando a piridostigmina e o número de pacientes foi superior aos observado em outras pesquisas. A amostra avaliada apresentou idade média acima de 55 anos e VFC de 24 horas inferior à média brasileira para indivíduos saudáveis [19]. Quando comparada ao placebo, a administração de 30 mg de piridostigmina três vezes ao dia, não modificou a modulação autonômica de 24 horas, avaliada pela VFC.

A ação da piridostigmina sobre a modulação autonômica ocorre pelo bloqueio da ação da acetilcolinesterase e conseqüente redução da hidrolização da acetilcolina

endógena. Ela age periféricamente sem atravessar a barreira hematoencefálica, pode ser administrada oralmente e seu efeito colinomimético é reversível e dose-dependente [9, 21]. Em indivíduos saudáveis, a piridostigmina melhorou a modulação vagal promovendo aumento da VFC de 24h e redução da FC durante o repouso [11], durante a estimulação simpática com estresse mental [22] e o exercício físico [23]. Enquanto em jovens treinados, a droga não alterou a FC de repouso e a recuperação da FC pós-exercício [24].

O efeito da piridostigmina sobre a modulação vagal também já foi avaliado em portadores de disfunção autonômica, como pacientes com ICC. Após administrar uma única dose de 30 mg de piridostigmina a 20 pacientes com ICC, Androne et. al. [25] observaram redução da FC de repouso e melhora da recuperação da FC pós-exercício. Serra et al. [26] observaram redução da FC durante o exercício submáximo e no período de recuperação pós-exercício em 23 portadores de ICC, após a administração de 45 mg de piridostigmina durante 24 h. Além disso, Behling et. al. [13] estudaram o efeito de 30 mg de piridostigmina em 23 pacientes portadores de ICC com e sem arritmias ventriculares freqüentes e observaram que a droga foi capaz de aumentar a VFC de 24 horas e reduzir em 65% a densidade das arritmias ventriculares.

Em pacientes portadores de DM2, algumas intervenções farmacológicas e não-farmacológicas mostraram-se eficazes para melhorar a modulação autonômica, como o uso prolongado dos beta bloqueadores [27, 28] e dos inibidores da enzima conversora de angiotensina [29], o treinamento físico [8, 31] e o transplante de pâncreas e rim associados [9]. Contudo, nos estágios mais graves de NAC, os efeitos de algumas dessas intervenções mostram-se reduzidos ou ausentes [8, 29].

Em nosso estudo, a ausência de efeito da piridostigmina sobre a modulação autonômica, avaliada pela VFC, pode ter sido causada pelo grande número de pacientes com NAC grave. Por outro lado, este efeito reduzido pode estar relacionado com o processo patogênico da NAC no DM, que ainda não é totalmente compreendido e abrange diversos fatores como alterações metabólicas, insuficiência neurovascular, danos auto-imunes, deficiência nos fatores de crescimento neurohormonais e prejuízos locais da atividade parassimpática com alteração na função de receptores adrenérgicos e/ou muscarínicos [3, 31].

A liberação de Acetilcolina (Ach) nas junções neuro-efetoras do coração é regulada pelo sistema nervoso central, mas também é influenciada periféricamente, por receptores muscarínicos e por auto-receptores pré-sinápticos localizados nas fibras parassimpáticas pós-ganglionares [32, 33]. Estes auto-receptores são subtipos de receptores muscarínicos e quando ativados pela Ach endógena, inibem a liberação de Ach na fenda sináptica, realizando uma retroalimentação negativa (*feedback negativo*) [31, 32, 34].

Análises *in vitro* e *in vivo* indicam que a atividade e a densidade dos receptores muscarínicos cardíacos são inversamente proporcionais ao aumento da idade [33, 35]. Oberhauser et. al. [31] realizaram análises farmacológicas e moleculares em tecidos atriais de 96 pacientes, entre os quais 18 apresentavam DM, e observaram que respostas muscarínicas alteradas estão diretamente relacionadas com a idade e complicações diabéticas tardias. Os autores sugerem que estas alterações podem refletir redução na inervação parassimpática, na habilidade de geração de Ach ou um aumento compensatório (*up regulation*) da função dos auto-receptores, levando a uma redução na liberação de Ach [31]. Dados similares foram observados em ratos diabéticos por estreptozotocina (STZ). Latifpour e McNeill [36] e Carrier et. al. [37], detectaram diminuição na densidade de receptores muscarínicos ventriculares e atriais desses animais. Além disso, análises morfológicas do nervo vago de ratos espontaneamente diabéticos (BB) mostraram aumento irregular de deposição de glicogênio e redução no tamanho axonal, quando comparados com ratos controle [38], demonstrando que a atividade parassimpática também pode estar modificada por uma alteração na transmissão da fibra nervosa.

Considerando que os auto-receptores representam um mecanismo de regulação fina na amplitude dos sinais químicos [39] e que a atividade dos receptores muscarínicos e do nervo vago é essencial para a atividade parassimpática, as alterações nessas estruturas poderiam modificar a produção, liberação e/ou captação da Ach. Neste caso, a inibição da acetilcolinesterase, através de drogas como a piridostigmina, seria incapaz de aumentar a atividade da Ach, como observado no presente estudo.

### **Limitações do Estudo**

Neste estudo, a dose de piridostigmina não foi validada pela avaliação da atividade sérica da acetilcolinesterase, entretanto, em estudo prévio de nosso grupo já demonstramos que 30 mg de piridostigmina são suficientes para reduzir em 14% os níveis de acetilcolinesterase [11]. Não podemos descartar que doses maiores de piridostigmina possam produzir efeitos distintos e que a ausência de efeito da piridostigmina talvez possa ser explicada pela maior gravidade da NAC nos pacientes do grupo PI (58% com NAC moderada/grave), aumentando a probabilidade deles apresentarem comprometimento dos receptores e/ou aumento na ação dos auto-receptores muscarínicos, comprometendo o efeito da droga. O pequeno número de pacientes estudados também pode ser responsável por nossos resultados. O tamanho da amostra baseou-se nos estudos prévios de nosso grupo com indivíduos saudáveis e em portadores de ICC [11, 13] nos quais a mesma dose de piridostigmina foi capaz de aumentar significativamente a VFC.

### **Conclusão**

A administração oral de piridostigmina durante 24h não modifica a VFC em pacientes com DM2 e NAC.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo incentivo financeiro que proporcionou a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ziegler, D (1994). Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy: Prognosis, Diagnosis and Treatment. *Diabetes Metabolism Reviews* 10 (4): 339-383.
2. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF (1980). The Natural History of Diabetic Autonomic Neuropathy. *Q. J. Med.* 49 (193): 95-108.
3. Vinik, A; Maser, RE; Mitchell, BD; Freeman, R (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26: 1553–1579.
4. Vinik, AI and Ziegler, D (2007). Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Circulation*. 115: 387-397.
5. Schroeder EB, Chambless LE, Liao D, Prineas RJ, Evans GW, Rosamond WD, Heiss G (2005). Atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Diabetes, Glucose, Insulin, and heart rate variability. *Diabetes Care* 28: 668–674.
6. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O (1999). Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet* 353: 617–22.
7. Ikeda T, Iwata K, Tanaka Y (1999). Long-term effect of epalrestat on cardiac autonomic neuropathy in subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 43 (3): 193-8.
8. Howorka K, Pumprla J, Haber P, Koller-Strametz J, Mondrzyk J, Schabmann A (1997). Effects of physical training on heart rate variability in diabetic patients with various degrees of cardiovascular autonomic neuropathy. *Cardiovasc Res* 34(1): 206-14.
9. Cashion AK; Hathaway, DK; Milstead, EJ; R, L; Gaber, AO (1999). Changes in patterns of 24-hr heart rate variability after kidney and kidney-pancreas transplant. *Transplantation*. 68(12): 1846-50.
10. Stoelting, RK (1999). Anticholinesterase drugs and cholinergic agonists. In: *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. 3th ed. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, NY.
11. Nóbrega ACL, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP (2001). Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Research* 11: 11-17.

12. Arad M, Roth A, Zelinger J, Zivner Z, Rabinowitz B and Atsmon J (1992). Safety of pyridostigmine in hypertensive patients receiving beta blocker. *Am J Cardiol* 69 (5): 518-522.
13. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nobrega AC, Ribeiro JP (2003). Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J*; 146(3): 494-500.
14. Singer W, Sandroni P, Opfer-Gehrking TL, Suarez GA, Klein CM, Hines S, O'Brien PC, Slezak J, Low PA (2003). Pyridostigmine treatment trial in neurogenic orthostatic hypotension. *Arch Neurol.*; 63(4): 513-8.
15. Martina V, Bruno G, Tagliabue M, Maccario M, Bertaina S, Zumpano E, Arvat E, Ghigo E, Camanni F (1997). Repeated administration of growth hormone-releasing hormone with or without previous administration of pyridostigmine in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*; 29(4):180-3 (resumo).
16. Giustina A, Bresciani E, Tassi C, Girelli A, Valentini U (1994). Effect of pyridostigmine on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in lean and obese type II Diabetic patients. *Metabolism*. 43(7): 893-8.
17. American Diabetes Association (ADA) (2006). Standards of medical care in diabetes. I Classification and diagnosis. *Diabetes Care* 29 (1): S4-5.
18. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF (1985). The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*. 8:491-8.
19. Antelmi I, de Paula RS, Shinzato AR, Peres CA, Mansur AJ, Grupi CJ (2004). Influence of age, gender, body mass index, and functional capacity on heart rate variability in a cohort of subjects without heart disease. *Am J Cardiol* 93(3): 381-5.
20. Polanczyk CA, Rohde LE, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP (1998). Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol*. 79: 69-73.
21. Stein, RD; Backman, SB; Collier, B; Polosa, C (1997). Bradycardia produced by pyridostigmine and physostigmine. *Can J Anaesth* 44(12): 1286-1292.
22. Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Santos KB, Soares PP (1999). Cholinergic stimulation with blunts the cardiac responses to mental stress. *Clin Auton Research* 9: 11-16.

23. Serra, SM; Costa, CV; Bastos, BG; Santos, KB; Ramalho, SHR; Nóbrega, ACL (2001). Exercise stress testing in healthy subjects during cholinergic stimulation after a single dose of pyridostigmine. *Arq Bras Cardiol* 76(4): 279-84.
24. Dewland TA, Androne AS, Lee FA, Lampert RJ, Katz SD (2007). Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H86-92.
25. Androne AS, Hryniewicz K, Goldsmith R, Arwady A, Katz SD (2003). Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. *Heart*. 89(8): 854-8.
26. Serra SM, Costa RV, Teixeira De Castro RR, Xavier SS, Nóbrega AC (2009). Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J Card Fail*. 15(2): 124-9.
27. Ebbelohj E, Poulsen PL, Hansen KW, Knudsen ST, Molgaard H, Mogensen CE (2002). Effects on heart rate variability of metoprolol supplementary to ongoing ACE-inhibitor treatment in type 1 diabetic patients with abnormal albuminuria. *Diabetologia* 45: 965–975.
28. Lanza GA, Pitocco D, Navarese EP, Sestito A, Sgueglia GA, Manto A, Infusino F, Musella T, Ghirlanda G, Crea F (2007). Association between cardiac autonomic dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients: effect of beta-blockade. *Eur*
29. Kontopoulos AG, Athyros VG, Didangelos TP, Papageorgiou AA, Avramidis MJ, Mayroudi MC, Karamitsos DT (1997). Effect of chronic quinapril administration on heart rate variability in patients with diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 20(3): 355-61.
30. Loimaala A, Huikuri HV, Kööbi T, Rinne M, Nenonen A, Vuori I (2003). Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(7):1837-42.
31. Oberhauser, V; Schwertfeger, E; Rutz, T; Beyersdorf, F; Rump, LC (2001). Acetylcholine release in human heart atrium Influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age. *Circulation*.103: 1638-1643.
32. Wetzel GT, Brown JH (1985). Presynaptic modulation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic neurons. *Am J Physiol.*; 248(1 Pt 2):H33-9.



33. Brodde OE, Korschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski HR (1998). Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 101(2):471-8.
34. Coulson, FR. And Fryer, AD (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98(1): 59– 69.
35. Poller U, Nedelka G, Radke J, Pönicke K, Brodde OE (1997). Age-dependent changes in cardiac muscarinic receptor function in healthy volunteers. *J Am Coll Cardiol*; 29(1): 187-93.
36. Latifpour, J and McNeill, JH (1984). Cardiac Autonomic Receptors: Effect of Long-Term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 230(1): 242-9.
37. Carrier GO, Aronstam RS (1987). Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.*; 242(2): 531-5.
38. Yagihashi, S and Sima, AAF (1985). Diabetic autonomic neuropathy the distribution of structural changes in sympathetic nerves of the BB rat. *Am J Pathol* 121:138-147.
39. Langer SZ (2007). Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int.* 52(1-2): 26-30.

## **CHAPTER III – ORIGINAL ARTICLE**

### **INTRODUCTION**

Cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) is considered one of the most serious complications in diabetes mellitus (DM), occurring in ¼ of type 1 and 1/3 of type 2 DM patients (DM2) [1]. The autonomic dysfunction observed in these patients may increase mortality in 53% in 5 years [2] and it is related to the increased occurrence of silent myocardial ischemia, complex ventricular arrhythmia and sudden death [3, 4]. CAN is manifested by the reduction in heart rate variability (HRV) and is prematurely reduced in DM2 [5]. However, some interventions seem to enhance the autonomic modulation of these individuals with DM2, like the adequate glycemic control [6], the use of drugs [7], physical exercises [8] and pancreas transplantation [9].

Administration of Pyridostigmine Bromide, an acetylcholinesterase inhibitor, produces cholinergic stimulation preventing the hydrolysis of acetylcholine (ACh) and increasing its availability in sites of action [10]. This drug, clinically used for the treatment of myasthenia gravis, increases the vagal modulation in healthy [11] and hypertensive subjects [12], in heart failure patients (CHF) [13] and orthostatic hypotension [14] resulting in an increase in the heart rate variability (HRV).

Pyridostigmine has already been used in DM patients to evaluate growth hormone secretion response [15, 16], but its effects on the autonomic modulation are still unknown. The potential use of pyridostigmine as an alternative drug in the treatment of patients with autonomic dysfunction was the basis for the present study, which tested the hypothesis that short term oral administration of pyridostigmine increases the vagal modulation in DM2 with CAN patients.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Sample**

Thirty four (34) patients with diabetes mellitus type 2 [17] with cardiovascular autonomic neuropathy diagnosed by the presence of abnormal autonomic tests have been recruited. After being assessed by medical history and resting electrocardiogram, were excluded patients with age under 18 years and over 70 years, previous acute myocardial infarction, thyroid dysfunction, chronic obstructive pulmonary disease or bronchial asthma, heart rhythm disorders, active alcoholism or tobacco use in the previous 6 months, pregnancy and history of intolerance to pyridostigmine bromide. The protocol was approved by the Ethical Committee of the institution and the Informed Consent was obtained from each individual (Annex 1).

### **Study design**

This is a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. Following the initial evaluation, it has been carried out a randomized controlled trial in 34 patients divided in two groups: 17 individuals to the Pyridostigmine group (PY) and 17 individuals to the placebo group (PL).

### **Protocol**

Each patient visited the laboratory three times and their usual medication was not discontinued during the study. On the first visit, patients were submitted to the autonomic tests standardized by Ewing et. al. [18] for detection of cardiovascular autonomic neuropathy. On their second visit, a 24-hour electrocardiogram was recorded using a Holter recorder (SEER Light digital recorder; GE Medical Systems Information Technologies, Milwaukee, WI, USA). On their third visit, patients returned to the hospital, heart rate and blood pressure were measured at rest and a 24-hour electrocardiogram recording was initiated. Then, patients started taking Pyridostigmine Bromide (Mestinon, ICN, Brasil) 30 mg orally 3-times daily for 24 hours or placebo (PL). In order to detect potential side effects, patients stayed in the hospital under observation for 2 hours. Patients and researchers were blinded to the drug used by the patient (placebo or active drug).

## **Cardiovascular Autonomic Function Assessment**

The presence of CAN was diagnosed by a battery of five (5) cardiovascular autonomic tests described by Ewing et. al. [18]. With the aim of graduating the gravity of the autonomic dysfunction, a scale has been used to categorize the results of the tests. Each abnormal test scored one point and each marginal test scored  $\frac{1}{2}$  point, resulting 5 points. The patients were divided according to the following scoring categories: without CAN (0 – 0.5); initial CAN (1 – 2.5); moderate/severe (3 – 5).

Responses to HR (with Cardiofax Ecaps 12 – Nihon Kohden) were assessed during deep inspiration (normal values  $>15$ ), during Valsalva maneuver (normal values  $>1.2$ ) and in orthostatic position (normal values  $>1.04$ ). Responses to blood pressure (assessed by Dinamap™ vital signs monitor 1846sx, Criticon Inc.) were assessed in orthostatic position (normal values  $<10$ mmHg) and during handgrip (normal values  $>16$ mmHg).

## **Heart Rate Variability**

During ECG recording, patients were instructed to avoid intense physical activity and to fill in a diary with their activities, sleeping and waking hours, and symptoms. The usual medication was not discontinued during the recording.

Files containing normal R-R intervals were processed in a computer to calculate the following time domain indices of HRV: mean of all normal R-R intervals (mean RR); standard deviation of all normal R-R intervals (SDNN); root-mean-square of successive differences (RMSSD). The HRV in time domain measures had been calculated during the 24-hour recording time, in the night and day time, considering “night” the time period from 11p.m. to 7 a.m.

The three-dimensional return map was built from the series of all normal RR intervals, by plotting  $RR_n$  (RR intervals that occur during the studied time) versus the difference between RR intervals  $[(RR_{n+1}) - RR_n]$  x density of occupation (number of times that the same successive difference occurred to the same RR). The density of occupation was calculated for each grid resolution of 7,2ms and was represented in the third dimension where the RR intervals that occur during the analysed time were calculated according to the difference between the x-axis and the adjacent RR intervals

on the  $y$ -axis. The indices to quantify the three-dimensional return map were the following:  $P_1$  (inversely proportional to the slope in the plane that sections the maximum concentration of points), which represents the inclination of the peak of higher concentration of points;  $P_2$  (maximum longitudinal range), which represents the longitudinal length of the comet;  $P_3$  (maximum transversal range), which represents the width of the comet in the peak of higher concentration of points; MN (product of  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  and  $10^{-3}$ ), which represents the product of four partial indices.

The analyses of all 24-hour electrocardiograms were carried out using an MARS 8000 analyzer (GE, Milwaukee, WI, USA). All recordings were analyzed by an investigator blinded for the study.

### **Statistical Analysis**

The analyzed data are described as mean  $\pm$  standard deviation. Differences in clinical characteristics of the PY and PL groups were compared using Student's  $t$  test for continuous variables and Pearson's chi-square test. Repeated measures ANOVA was used to evaluate the effect of the interventions (PY and PL) on HRV. Data were analysed with the *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 14.0 software for Windows, and the minimum significance level was set at 5%.

## **RESULTS**

### **Sample Characteristics**

Thirty-eight patients were randomized to the PR and PL group, however, four abandoned the study. Table 1 describes the clinical features of the 34 patients that participated in the study. The two groups studied did not show any statistically significant change in relation to the described characteristics. Thirty-two (32) out of the thirty-four (34) patients presented systemic arterial hypertension.

### **Blood Pressure Response**

The systolic blood pressure (SBP) and the diastolic blood pressure (DBP) assessed during rest, before (pre) and after (post) the use of the drug/placebo are described in table 2. The measurements did not show any significant change, before

and after the use of the drug/placebo.

## **Autonomic Modulation**

### **Heart Rate Variability**

The 24-hour ECG analysis revealed a small number of ectopies, inferior to 1% of all analyzed beats. In Table 3 are presented the values of time domain HRV indices during 24-hour recordings before and after the use of PY and PL. The intra-group and inter-group analyses did not show any significant differences. In tables 4 and 5, respectively, are the results of time domain HRV indices found during the day and night times, before and after the use of PY and PL. In the inter-group analysis, pyridostigmine had no effect on HRV, comparing to PL, neither during the night or day. In the intra-group analysis, PY promoted a small but significant increase in the mean RR during the day.

### **Three-dimensional return map**

The variables studied in relation to the three-dimensional map are described in detail in Table 7. The partial indices P1, P2, P3 and the general index MN did not show any significant changes when intra and inter-groups comparisons were made.

## **DISCUSSION**

In these randomized placebo controlled clinical trial, it was assessed for the first time the effect of cholinergic stimulation with pyridostigmine bromide in DM2 patients with initial or severe CAN. Our sample was composed of older patients, with a mean age over 55 years old, and reduced 24-hour HRV comparing to the Brazilian average for healthy individuals of the same age [19]. When compared with the placebo, the administration of 30 mg of pyridostigmine three times a day did not change the 24-hour autonomic modulation assessed by HRV.

The action of pyridostigmine on the autonomic modulation occurs by the blockade of the action of the acetylcholinesterase and consequent reduction of the hydrolysis of the endogenous acetylcholine. It acts peripherally without crossing the blood-brain barrier, it can be administered orally and its cholinomimetic effect is

reversible and dose-dependent [9, 21]. In healthy individuals, pyridostigmine improves the vagal modulation promoting an increase in 24-hour HRV, and a reduction of HR during rest [11], sympathetic stimulation with mental stress [22] and physical exercise [23]. In healthy trained youngsters, the drug does not alter resting HR and the recovering of post exercise HR [24].

The effect of pyridostigmine on the vagal modulation was already studied in individuals with autonomic dysfunction, like CHF patients. After administering a single dose of 30 mg of pyridostigmine to 20 CHF patients, Androne et. al. [25] observed the reduction of resting HR and an improvement in post exercise HR. Serra et. al. [26] observed HR reduction during submaximal exercise and during recovery after exercise in 23 CHF patients, after 24-hour administration of 45mg of pyridostigmine [26]. Behling et. al. studied the effect of 30 mg orally 3-times daily for 48 hours in 23 CHF patients with and without frequent ventricular arrhythmia. Pyridostigmine increased 24-hour HRV and reduced in 65% the density of ventricular arrhythmias [13].

In DM2 patients, some pharmacological and non-pharmacological interventions have proved to be effective to enhance the autonomic modulation, such as the long term use of beta blockers [27, 28] and angiotensin converting enzyme inhibitors [29], physical training [8,30] and kidney-pancreas transplantation [9]. In our study, the absence of the effect of pyridostigmine on the autonomic modulation, assessed by HRV, could be caused by the great number of patients with severe CAN.

On the other hand, this reduced effect can be related to the pathogenic process of CAN in DM, which is not fully understood yet and embraces several factors like neurovascular insufficiency, autoimmune damage, neurohormonal growth factor deficiency and local parasympathetic dysfunction, such as alterations in the adrenergic and/or muscarinic receptor functions [3, 31].

The release of Acetylcholine (Ach) at the neuroeffector junction of the heart is regulated by the central nervous system, but it is also peripherally influenced by muscarinic receptors and pre-synaptic autoreceptors found at the postganglionic parasympathetic fibers [32, 33]. These autoreceptors are muscarinic receptors subtypes that, when activated by endogenous Ach, inhibit the release of Ach in the synaptic cleft, causing a negative feedback [31, 32, 34].

*In vitro* and *in vivo* analyses indicate that cardiac muscarinic receptors activity and the density are inversely proportional to the increasing age [33, 35]. Oberhauser et. al [31] conducted pharmacological and molecular analyses in atrial tissues of 96 patients, among whom 18 had DM, and observed an inverse relation between the proper muscarinic response and the presence of diabetic complications. The authors suggest that these alterations may reflect a reduction in the parasympathetic innervation, in the ability to produce Ach or an up regulation of the autoreceptor function, leading to a reduction in the release of Ach [31]. Similar data were observed in diabetic rats by streptozotocin (STZ). Latifpour and McNeill [36] and Carrier et. al. [37], detected a reduction in the ventricular and atrial muscarinic receptor density of these animals. Moreover, morphological analyses of the vagus nerve in spontaneous diabetic rats (BB) showed an irregular increase in the disposition of glycogen and a reduction of the axon size, when compared with controlled rats [38], proving that the parasympathetic activity can also be changed by an alteration in the nerve fiber transmission. Considering that the autoreceptors represent a mechanism of fine tuning regulation in the amplitude of the chemical signals [39] and that the muscarinic receptor and vagus nerve activity is essential to the parasympathetic activity, the alterations in these structures could modify the Ach production, release and/or uptake. In this case, acetylcholinesterase inhibition, with the use of drugs like pyridostigmine, would not be able to increase Ach activity since a small amount of Ach is being released in the cleft, as seen in the present study.

### **Study limitations**

In this study, the dose of pyridostigmine was not validated by the assessment of the serum cholinesterase activity. Although we shown, in a previous study of our group, that 30 mg of pyridostigmine reduces the acetylcholinesterase levels in 14% [11]. We cannot discard that higher doses of pyridostigmine could increase HRV in our patients and another possibility to explain the absence of effect is the higher number of patients (58%) with moderate/severe NAC treated with pyridostigmine that could increase the probability of having more muscarinic receptor impairment and/or an increase in the action of the muscarinic autoreceptors, compromising the effect of the drug. The small



number of patients studied may also explain our results. The sample size was based on previous studies of our group with healthy [11] and CHF patients [13] in whom the same dose of pyridostigmine significantly increased the HRV.

### **Conclusion**

Oral administration of pyridostigmine does not increase heart rate variability in type 2 diabetes mellitus patients with cardiovascular autonomic neuropathy.

### **Acknowledgements**

Thanks to the Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the financial incentive provided for this work.

## REFERENCES

1. Ziegler, D (1994). Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy: Prognosis, Diagnosis and Treatment. *Diabetes Metabolism Reviews* 10 (4): 339-383.
2. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF (1980). The Natural History of Diabetic Autonomic Neuropathy. *Q. J. Med.* 49 (193): 95-108.
3. Vinik, A; Maser, RE; Mitchell, BD; Freeman, R (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26: 1553–1579.
4. Vinik, AI and Ziegler, D (2007). Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. *Circulation*. 115: 387-397.
5. Schroeder EB, Chambless LE, Liao D, Prineas RJ, Evans GW, Rosamond WD, Heiss G (2005). Atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Diabetes, Glucose, Insulin, and heart rate variability. *Diabetes Care* 28: 668–674.
6. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O (1999). Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet* 353: 617–22.
7. Ikeda T, Iwata K, Tanaka Y (1999). Long-term effect of epalrestat on cardiac autonomic neuropathy in subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 43 (3): 193-8.
8. Howorka K, Pumplia J, Haber P, Koller-Strametz J, Mondrzyk J, Schabmann A (1997). Effects of physical training on heart rate variability in diabetic patients with various degrees of cardiovascular autonomic neuropathy. *Cardiovasc Res* 34(1): 206-14.
9. Cashion AK; Hathaway, DK; Milstead, EJ; R, L; Gaber, AO (1999). Changes in patterns of 24-hr heart rate variability after kidney and kidney-pancreas transplant. *Transplantation*. 68(12): 1846-50.
10. Stoelting, RK (1999). Anticholinesterase drugs and cholinergic agonists. In: *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. 3th ed. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, NY.
11. Nóbrega ACL, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP (2001). Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Research* 11: 11-17.

12. Arad M, Roth A, Zelinger J, Zivner Z, Rabinowitz B and Atsmon J (1992). Safety of pyridostigmine in hypertensive patients receiving beta blocker. *Am J Cardiol* 69 (5): 518-522.
13. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nobrega AC, Ribeiro JP (2003). Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J*; 146(3): 494-500.
14. Singer W, Sandroni P, Opfer-Gehrking TL, Suarez GA, Klein CM, Hines S, O'Brien PC, Slezak J, Low PA (2003). Pyridostigmine treatment trial in neurogenic orthostatic hypotension. *Arch Neurol.*; 63(4): 513-8.
15. Martina V, Bruno G, Tagliabue M, Maccario M, Bertaina S, Zumpano E, Arvat E, Ghigo E, Camanni F (1997). Repeated administration of growth hormone-releasing hormone with or without previous administration of pyridostigmine in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*; 29(4):180-3 (resumo).
16. Giustina A, Bresciani E, Tassi C, Girelli A, Valentini U (1994). Effect of pyridostigmine on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in lean and obese type II Diabetic patients. *Metabolism*. 43(7): 893-8.
17. American Diabetes Association (ADA) (2006). Standards of medical care in diabetes. I Classification and diagnosis. *Diabetes Care* 29 (1): S4-5.
18. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF (1985). The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care*. 8:491-8.
19. Antelmi I, de Paula RS, Shinzato AR, Peres CA, Mansur AJ, Grupi CJ (2004). Influence of age, gender, body mass index, and functional capacity on heart rate variability in a cohort of subjects without heart disease. *Am J Cardiol* 93(3): 381-5.
20. Polanczyk CA, Rohde LE, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP (1998). Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol*. 79: 69-73.
21. Stein, RD; Backman, SB; Collier, B; Polosa, C (1997). Bradycardia produced by pyridostigmine and physostigmine. *Can J Anaesth* 44(12): 1286-1292.
22. Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Santos KB, Soares PP (1999). Cholinergic stimulation with blunts the cardiac responses to mental stress. *Clin Auton Research* 9: 11-16.

23. Serra, SM; Costa, CV; Bastos, BG; Santos, KB; Ramalho, SHR; Nóbrega, ACL (2001). Exercise stress testing in healthy subjects during cholinergic stimulation after a single dose of pyridostigmine. *Arq Bras Cardiol* 76(4): 279-84.
24. Dewland TA, Androne AS, Lee FA, Lampert RJ, Katz SD (2007). Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1): H86-92.
25. Androne AS, Hryniewicz K, Goldsmith R, Arwady A, Katz SD (2003). Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. *Heart*. 89(8): 854-8.
26. Serra SM, Costa RV, Teixeira De Castro RR, Xavier SS, Nóbrega AC (2009). Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J Card Fail*. 15(2): 124-9.
27. Ebbelohj E, Poulsen PL, Hansen KW, Knudsen ST, Molgaard H, Mogensen CE (2002). Effects on heart rate variability of metoprolol supplementary to ongoing ACE-inhibitor treatment in type 1 diabetic patients with abnormal albuminuria. *Diabetologia* 45: 965–975.
28. Lanza GA, Pitocco D, Navarese EP, Sestito A, Sgueglia GA, Manto A, Infusino F, Musella T, Ghirlanda G, Crea F (2007). Association between cardiac autonomic dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients: effect of beta-blockade. *Eur*
29. Kontopoulos AG, Athyros VG, Didangelos TP, Papageorgiou AA, Avramidis MJ, Mayroudi MC, Karamitsos DT (1997). Effect of chronic quinapril administration on heart rate variability in patients with diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 20(3): 355-61.
30. Loimaala A, Huikuri HV, Kööbi T, Rinne M, Nenonen A, Vuori I (2003). Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(7):1837-42.
31. Oberhauser, V; Schwertfeger, E; Rutz, T; Beyersdorf, F; Rump, LC (2001). Acetylcholine release in human heart atrium Influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age. *Circulation*.103: 1638-1643.
32. Wetzel GT, Brown JH (1985). Presynaptic modulation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic neurons. *Am J Physiol.*; 248(1 Pt 2):H33-9.

33. Brodde OE, Korschak U, Becker K, Ruter F, Poller U, Jakubetz J, Radke J, Zerkowski HR (1998). Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. *J Clin Invest* 101(2):471-8.
34. Coulson, FR. And Fryer, AD (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98(1): 59– 69.
35. Poller U, Nedelka G, Radke J, Pönicke K, Brodde OE (1997). Age-dependent changes in cardiac muscarinic receptor function in healthy volunteers. *J Am Coll Cardiol*; 29(1): 187-93.
36. Latifpour, J and McNeill, JH (1984). Cardiac Autonomic Receptors: Effect of Long-Term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.* 230(1): 242-9.
37. Carrier GO, Aronstam RS (1987). Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther.*; 242(2): 531-5.
38. Yagihashi, S and Sima, AAF (1985). Diabetic autonomic neuropathy the distribution of structural changes in sympathetic nerves of the BB rat. *Am J Pathol* 121:138-147.
39. Langer SZ (2007). Presynaptic autoreceptors regulating transmitter release. *Neurochem Int.* 52(1-2): 26-30.

**Table 1:** Sample clinical features.

	<b>PY (n=17)</b>	<b>PL (n=17)</b>
Age (years)	59 ± 8	56 ± 11
Gender F/M	9/8	8/9
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	30 ± 4	28 ± 2.8
DM time (years)	11.3 ± 8	11 ± 7.3
<b>Ewing, n (%)</b>		
Initial CAN	7 (41)	11 (65)
Moderate/severe CAN	10 (59)	6 (35)
<b>Medications, n (%)</b>		
NPH Insulin	6 (35.3)	6 (35.3)
Metformin	11 (64.7)	11 (64.7)
Sulfonylureas	3 (17.6)	3 (19)
ACE Inhibitor	11 (64.7)	10 (59)
Statins	3 (17.6)	2 (12)
Acetylsalicylic acid	10 (59)	7 (41)
Ca channel blocker	3 (17.6)	3 (17.6)
Diuretics	7 (41)	10 (59)
Beta Blocker	3 (17.6)	5 (31)

Values represented as mean ± standard deviation.  
ACE: angiotensin-converting enzyme inhibitor.

**Table 2:** SBP and DBP during rest.

	PY (n=17)		PL (n=17)	
	PRE	POST	PRE	POST
SBP Rest	145 ± 19	131 ± 17	144 ± 27	138 ± 24
DBP Rest	79 ± 11	74 ± 10	83 ± 13	79 ± 14

Repeated-measures ANOVA. Values represented as mean ± standard deviation. PRE: before the use of drug/placebo; POST: 24-hour use of drug/placebo.

**Table 3:** HRV in the 24-hour time domain

	PY (n=17)		PL (n=17)	
	PRE	POST	PRE	POST
RRMed	727 ± 74	748 ± 99	733 ± 104	733 ± 111
SDNN	100 ± 28	107 ± 26	104 ± 40	108 ± 36
RMSSD	19 ± 9.5	21 ± 13	19 ± 9	20 ± 10

Repeated-measures ANOVA. Values represented as mean ± standard deviation. PRE: before the use of drug/placebo; POST: 24-hour use of drug/placebo.

**Table 4:** HRV in the **day** time domain.

	PY (n=17)		PL (n=17)	
	PRE	POST	PRE	POST
RRMed	685 ± 72	708.5 ± 100*	708 ± 113	688 ± 120
SDNN	53 ± 15	56 ± 15	54 ± 20	56 ± 22
RMSSD	17 ± 9	18 ± 13	17 ± 9	19 ± 11

Repeated-measures ANOVA. Values represented as mean ± standard deviation. PRE: before the use of drug/placebo; POST: 24-hour use of drug/placebo.\*P = 0,014 for group PY and interaction effects.

**Table 5:** HRV in the **night** time domain.

	PY (n=17)		PL (n=17)	
	PRE	POST	PRE	POST
RRMed	801 ± 102	844 ± 107	806 ± 127	822 ± 102
SDNN	55 ± 18	61.5 ± 17	57 ± 23	56 ± 24
RMSSD	21.5 ± 12	22 ± 13	22 ± 12.5	22 ± 10

Repeated-measures ANOVA. Values represented as mean ± standard deviation. PRE: before the use of drug/placebo; POST: 24-hour use of drug/placebo.

**Table 6:** Three-dimensional Return Map Indices.

	PY (n=17)		PL (n=17)	
	PRE	POST	PRE	POST
P1	61 ± 10	63 ± 11	63 ± 12	69 ± 14
P2	65 ± 16	66 ± 13	61 ± 15.5	63 ± 15
P3	89 ± 34	86 ± 34	79 ± 15.5	80 ± 24
MN	375 ± 211	392 ± 241	324 ± 197	369 ± 185

Repeated-measures ANOVA. Values represented as mean ± standard deviation. PRE: before the use of drug/placebo; POST: 24-hour use of drug/placebo.