



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

GEAN DOMINGOS DA SILVA SOUZA

**Respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo
de ratos acordados normotensos e hipertensos (SHR)**

TESE DE DOUTORADO

Ribeirão Preto
2016

GEAN DOMINGOS DA SILVA SOUZA

**Respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo
de ratos acordados normotensos e hipertensos (SHR)**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências – área de concentração em Fisiologia.
Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Jr

Ribeirão Preto

2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Gean Domingos da Silva

Respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo de ratos acordados normotensos e hipertensos (SHR). Ribeirão Preto, 2016.

171 p: Il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Fazan, Rubens

1. barorreflexo. 2. hemodinâmica. 3. estimulação elétrica. 4. seio carotídeo. 5. hipertensão. 6. variabilidade da frequência cardíaca.

FOLHA DE APROVAÇÃO

GEAN DOMINGOS DA SILVA SOUZA

Respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo de ratos acordados normotensos e hipertensos (SHR)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências – área de concentração em Fisiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura:

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura:

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura:

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura:

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura:

Dedicatória

À soberano Deus primeiramente, pela oportunidade me dada para cumprir com êxito esta etapa da minha vida gozando de plena saúde, vigor físico, mental e espiritual. À minha família, com especial reconhecimento à minha Mãe Leonice e meu Pai Sebastião, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho, o qual se tornou indispensável e fundamental para superar todos os obstáculos durante o percurso de toda minha formação. Minha irmã Gabriela, Lívia, meu cunhado Marcos Demétrio e a minha sobrinha Antonella (em formação fetal), por sempre me acompanharem e apoiarem em todos os momentos.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Não poderia de forma alguma, deixar de agradecer à companheira de laboratório **Fernanda Machado Santos de Almeida** pelo valor inestimável da amizade cultivada durante o árduo desenvolvimento deste trabalho e ao imenso companheirismo, colaboração e incentivo para a realização do mesmo. Sem me esquecer, que quando cheguei em Ribeirão Preto foi quem me incentivou desde à realização da prova de ingresso às dúvidas e inseguranças que eu tinha e tive no decorrer do tempo, e não foram poucas. Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, me ensinou tantas coisas que além de me co-orientar, me ajudou a ser uma pessoa melhor em todos os aspectos, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Seus ensinamentos profissionais e de vida me acompanharão por onde eu estiver. Ao amigo **César Arruda Meschiari** que foi um companheiro inestimável que muito contribuiu, e de maneira árdua para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso um agradecimento especial à **Geisa Tezini** pela colaboração e momentos memorosos de trabalho e descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP (2013/13269-8)**, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao **Departamento de Fisiologia** e a **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, por colocar à disposição a área experimental e os laboratórios para obtenção dos resultados experimentais e a todos os Professores Doutores e funcionários do departamento. Ao Prof. Dr. Rubens Fazan pela orientação e

ao Prof. Dr. Hélio César Salgado, que muito contribuíram ao meu crescimento profissional, muito mesmo. Aos técnicos Jaci e Beto pelo suporte e aos colegas de laboratório e do programa e pós-graduação em Fisiologia.

Não posso me esquecer de agradecer ao apoio da Prof. Dr. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia e suas alunas Camila Pereira e Nathanne, pela imensa contribuição.

Aos amigos que torceram para que eu realizasse mais essa conquista em minha vida, sempre me apoiando e torcendo por mim. São eles: *Mariana Souza, Denise Gonçalves, Aniele Vilarino, Victória Barbosa, Carla M. Girardi, Emily Abrão, Sharon Moraes, João Paulo Jacob Sabino, Larissa Oliveira, Nayara Pestana, Isabelle Rodrigues, Bruna Kalil*. A todos estes, meu imenso agradecimento e admiração. Aos amigos do coração, que nestes últimos tempos em Ribeirão Preto se fizeram minha família e nossos laços se estenderão e eternizarão. São eles: *Victória Barbosa, Laís Fichinha, Mônica e Maísa Borboni, Natália Gianini (que além de ser amiga) me incentivou todo esse período a praticar corrida e muita atividade física*. Não poderia deixar de agradecer minha companheira e conselheira da vida, de viagens e tudo mais, *Marina Scafuto*, a quem aprendi amar muito.

Não poderia me esquecer da minha primeira professora do jardim de infância *Terezinha de Fátima Sândalo* e a do ensino fundamental *Neide Cervantes Gorgone Arruda* que plantou em mim a semente da investigação científica.

Epígrafe

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão”.

Thomas Wolfe

Resumo

RESUMO

Respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo de ratos acordados normotensos e hipertensos (SHR)

O barorreflexo arterial é o principal mecanismo de regulação a curto prazo da pressão arterial (PA), mantendo-a dentro de um estreito limite de variação. A elevação da PA estimula sensores mecânicos (barorreceptores), que levam a uma inibição simpática e aumento da atividade vagal cardíaca, provocando queda (normalização) da PA. A estimulação elétrica de aferências dos barorreceptores é uma técnica que surgiu na década de 60 e, atualmente, vem sendo utilizada em pacientes com hipertensão refratária. Hipotetizamos que a estimulação elétrica do SC seria capaz de promover alterações hemodinâmicas e na modulação autonômica cardiovascular de ratos normotensos e SHR. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar respostas hemodinâmicas, variabilidade da frequência cardíaca (FC) e PA, e avaliar alterações vasculares à estimulação elétrica do seio carotídeo (SC) em ratos normotensos ou espontaneamente hipertensos (SHR). Ratos Wistar ou SHR, com 300g (15 a 18 semanas) foram anestesiados (ketamina e xilazina) e implantados com eletrodos ao redor do SC e cânula na artéria femoral. No dia seguinte, após registro basal da PA, o SC dos ratos foi estimulado com pulsos de 1 mA, 1 ms e 15, 30, 45 ou 60 Hz durante 20 s. A seguir, um estímulo prolongado (60 min) com pulsos de 1 mA, 1 ms e 30 Hz foi aplicado ao SC dos ratos de forma contínua ou intermitente (20/20s ON/OFF). Um grupo distinto

de SHR foi implantado (SC) com um estimulador miniaturizado capaz de gerar, ininterruptamente, pulsos de 3 V, 1 ms, e 30 Hz, de modo intermitente (20/20s ON/OFF). Nesses animais, no dia seguinte ao implante dos eletrodos, foi realizado um registro basal da PA e o estimulador foi ligado, estimulado o SC durante 48 h. Após o término da estimulação, um novo registro da PA foi realizado e, ao final, o leito mesentérico dos ratos foi removido para análise de reatividade vascular. A estimulação elétrica de curta duração (20 s) provocou uma resposta hipotensora, que foi maior em SHR ($\Delta = -16$ a -48 mmHg, $n=14$) do que em ratos normotensos ($\Delta = -19$ a -28 mmHg, $n=10$). A hipotensão causada pela estimulação do SC foi frequência dependente apenas nos SHR. Uma bradicardia, semelhante em ambos os grupos (Wistar e SHR), e não dependente da frequência de estimulação, também foi observada com a estimulação do SC. Na estimulação prolongada (60 min), realizada de forma contínua ou intermitente, também houve hipotensão e bradicardia que se mantiveram durante todo o período de estímulo. A hipotensão durante o estímulo de 60 min do SC também foi maior em SHR (-38 ± 9 mmHg) do que em ratos Wistar (-15 ± 5 mmHg). A análise simbólica, antes e durante a estimulação do SC, no grupo que recebeu estimulação contínua, revelou um aumento na porcentagem de sequências tipo 2UV da FC (relacionadas à modulação vagal cardíaca) de 37 ± 3 para 45 ± 4 %. A análise espectral mostrou diminuição na potência do espectro da PA na banda de LF (relacionada à modulação simpática cardíaca e vascular) de 3.6 ± 0.3 para 0.7 ± 0.1 mmHg² apenas em animais normotensos. Os SHR estimulados cronicamente (48 h) tiveram uma PA menor após o final do estímulo (173 ± 5 vs 150 ± 5 mmHg). Entretanto, a variabilidade da FC e da PA não foi alterada pela estimulação

crônica do SC. Adicionalmente, o estímulo elétrico crônico do SC promoveu aumento na reatividade das artérias mesentéricas à Acetilcolina, e à fenilefrina, tanto na presença como na ausência do endotélio. A resposta hipotensora perdurou até 60 minutos após o desligamento do dispositivo de estimulação. Concluindo, a estimulação elétrica do SC de ratos acordados, normotensos ou SHR é efetiva em diminuir a PA e FC além de promover alterações na variabilidade da FC e da PA condizentes à redução da modulação simpática em animais normotensos. Adicionalmente, a estimulação crônica do SC promoveu alterações em vasos de resistência.

Abstract

ABSTRACT

Cardiovascular responses to electrical stimulation of carotid sinus in conscious normotensive and Hypertensive rats (SHR)

Arterial baroreflex is the main short-term regulation mechanism of blood pressure (BP), keeping it under narrow limits of variation. The increasing of BP stimulates mechanical sensors (baroreceptors), which lead to inhibition of sympathetic drive and increasing cardiac activity of vagus nerve, resulting in decrease (normalization) of the BP. Electrical stimulation of afferent baroreceptor is an approach that emerged in the 60s and is now being used in patients with resistant hypertension. We hypothesized that electrical stimulation of CS promote hemodynamic and autonomic responses in normotensive and SHR. The aim of this study was to characterize hemodynamic responses, heart rate (HR) and BP variability, and evaluate vascular changes to electrical stimulation of the carotid sinus (CS) in normotensive or spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR and Wistar rats with 300g (15 to 18 wk) were anesthetized (ketamine and xylazine) and implanted with electrodes in CS and a catheter into femoral artery. On the next day, after baseline recording of the BP, animals were subjected to electrical stimulation of CS with pulses of 1 mA, 1 ms and 15, 30, 45 or 60 Hz during 20 s. Following, a continuously or intermittently (20 / 20s ON / OFF) prolonged stimulation (60 min) with pulses of 1 mA, 1 ms and 30 Hz was applied to CS of rats. Another SHR group was implanted with a miniaturized stimulator connected to CS electrodes, capable of generating uninterruptedly pulses of 3

V, 1 ms, and 30 Hz, intermittently (20/20s ON/OFF). On the next day, after baseline recording of BP, the stimulator was turned on, and CS was stimulated during 48 h. After the end of stimulation, another BP recording was performed and the mesenteric bed of rats was removed for analysis of vascular reactivity. Short-term (20 s) electrical stimulation of CS induced a hypotensive response that was greater in SHR ($\Delta = -16$ to -48 mmHg, $n = 14$) than in normotensive rats ($\Delta = -19$ to -28 mmHg, $n = 10$). Hypotensive response was dependent on stimulation frequency only in SHR. A bradycardic response, similar in both groups (Wistar and SHR) and not dependent of the frequency of stimulation was also observed. In prolonged stimulation (60 min), performed continuously or intermittently, hypotension and bradycardia were observed during whole stimulation period. Hypotensive effect observed during 60 min stimulation of the CS was greater in SHR (-38 ± 9 mmHg) than in Wistar rats (-15 ± 5 mmHg). The symbolic analysis, before and during the stimulation of the CS revealed an increase in the percentage of 2UV type sequences of HR (related to cardiac vagal modulation) from 37 ± 3 to 45 ± 4 %. Spectral analysis showed in the decrease power of BP spectrum in LF band (related to heart and vascular sympathetic modulation) from 3.6 ± 0.3 to 0.7 ± 0.1 mmHg² only in normotensive animals. SHR chronically stimulated group (48 h) showed lower BP after the end of the stimulus (173 ± 5 vs 150 ± 5 mmHg). However, the variability of HR and BP was not changed by chronic stimulation of the CS. Moreover, chronic electrical stimulation of the CS increased the reactivity of mesenteric arteries to acetylcholine and phenylephrine, both in the presence or absence of the endothelium. The hypotensive response lasted after 60 minutes after the shutdown of the stimulation device. In conclusion, the electrical

stimulation of CS in normotensive or SHR conscious rats is effective in decreasing BP and HR and promotes changes in the variability of HR and BP, consistent with reduction of sympathetic modulation in normotensive animals. Additionally, the chronic stimulation of the CS induced changes in resistance vessels.

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

0V – zero variação

1V – uma variação

2UV – duas variações

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

Ang II – angiotensina 2

AVC - acidente vascular cerebral

Ca²⁺ - cálcio

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CVLM – medula ventrolateral caudal

DCV – doença cardiovascular

EDHF - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDRFs – fator relaxante derivado do endotélio

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EETs - ácidos epoxyeicosatrienoic

ERO – espécie reativa de oxigênio

ET-1 – endotelina 1

FC – frequência cardíaca

g - grama

GCS – guanilato ciclase solúvel

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

HF – alta frequência

Hz – hertz

IP – intervalo de pulso

K⁺ - potássio

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio Monobásico

kPa – quilo pascal

kΩ – kilo-ohm

LF – baixa frequência

mA – miliampères

mg – miligrama

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

mM – nanomol

mmHg – milímetros de mercúrio

ms – milissegundos

NaCl - Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NO – óxido nítrico

NTS – núcleo do trato solitário

PA – pressão arterial

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

pH – potencial hidrogênio

PKG – proteína quinase G

RVLM – medula ventrolateral rostral

SC – seio carotídeo

SHR – rato espontaneamente hipertenso

V – volts

VLF – muito baixa frequência

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da estimulação elétrica do SC durante 60 min (1 mA, 1 ms, 30 Hz) sobre a variabilidade da FC e PÁ em ratos Wistar e SHR.....62

Tabela 2 - Resposta Máxima e sensibilidade a acetilcolina (ACh) em artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST).67

Tabela 3 - Resposta Máxima e sensibilidade ao nitroprussiato de Sódio (NPS) em artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST)..69

Tabela 4 - Resposta Máxima e sensibilidade a fenilefrina (Phe) em artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST)71

Tabela 5 - Resposta Máxima e sensibilidade a fenilefrina (Phe) em artérias mesentéricas sem endotélio isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST)..73

Tabela 6 - Variabilidade de intervalo de pulso (IP), análise simbólica e da pressão arterial sistólica (PAS) antes (basal) e após a estimulação crônica do SC esquerdo de SHR. dados expressos pela média \pm EPM...74

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática ilustrativa do sistema Rheos para estimulação elétrica do SC em pacientes com hipertensão arterial refratária ao tratamento farmacológico. Note o gerador de pulsos elétricos implantado no subcutâneo e os eletrodos de estimulação posicionados, bilateralmente, ao redor do SC.....33

Figura 2 - Representação ilustrativa do implante do eletrodo bipolar ao redor do SC para estimulação crônica desta estrutura35

Figura 3 - Registro eletrocardiográfico [esquerda] de um indivíduo normal, com a marcação dos intervalos entre sucessivas ondas R (T1 a T6) [direita] valores de 512 sucessivos intervalos RR (tacograma) de um indivíduo normal38

Figura 4 - Espectros ilustrativos do intervalo RR (painel superior), pressão arterial sistólica (PAS, painel intermediário) e da atividade respiratória (painel inferior), mostrando os componentes oscilatórios principais (LF e HF), encontrados na FC e na PA40

Figura 5 - Fotografia de um estimulador elétrico portátil implantável para estimulação crônica do SC de ratos.....46

Figura 6 - Esquema representativo de como foram aferidos os dados de impedância do SC ao longo de 10 dias. A resistência elétrica foi calculada de acordo com a fórmula: $U=R.i$47

Figura 7 - Exemplos representativos dos diferentes de padrões de variação utilizados na análise simbólica da variabilidade cardiovascular. Zero ou nenhuma variação (0V: painéis A e B), uma variação (1V: painéis C e D), padrões com 2 variações na mesma direção (2LV: painéis E e F) e padrões com duas variações em direções opostas (2UV: painéis G e H)53

Figura 8 - Traçados representativos mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP) (painel superior), pressão arterial média (linha branca) e frequência cardíaca (FC) (painel inferior) em resposta a estimulação elétrica curta (20 s) do SC (1 mA, 1 ms e

60Hz) de animais acordados, normotensos e SHR. As barras pretas representam os 20s de estimulação... 58

Figura 9 - Alterações (Δ) da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) observadas durante as diferentes frequências de estimulação (15, 30, 60, 90 Hz) do SC (20 s) em ratos Wistar (N = 10) ou SHR (N = 14). ** P<0,05 comparado com 15 Hz. # P<0.05 comparado com 30 Hz... 59

Figura 10 – Alterações hemodinâmicas da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) observadas durante 60 min de estimulação contínua (círculos pretos) ou intermitente (círculos brancos) do SC (1mA, 1ms, 30 Hz) em ratos Wistar (N = 10) ou SHR (N = 14), todos os valores de p <0,05 comparado com tempo 0 (antes da estimulação) na PAM. 61

Figura 11 – Alterações hemodinâmicas em delta (Δ) de variação da pressão arterial média (PAM) (painel A) e frequência cardíaca (FC) (painel B) observadas durante a estimulação crônica do SC (48 h) em SHR. * P<0,05 (N =10).. 64

Figura 12 - Traçados típicos, representativos mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP) (A e C), pressão arterial média (linha branca) e frequência cardíaca (FC) (B e D) em resposta a estimulação elétrica (20 s) do SC (1 mA, 1 ms e 3V) de animais acordados hipertensos controle e estimulados. Este traçado representa um trecho do registro de pressão arterial. As barras pretas representam os 20 s de estimulação..... 65

Figura 13 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para acetilcolina (ACh) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente. *p<0.05 vs. SHR..... 66

Figura 14 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) Resposta máxima para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente..... 68

Figura 15 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para fenilefrina (PhE) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR

controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente. *p<0.05 vs. SHR..... 70

Figura 16 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para fenilefrina (PhE) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente. *p<0.05 vs. SHR..... 72

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

.....	31
1.1 Estimulação elétrica dos barorreceptores.....	31
1.2 Modelo de hipertensão espontânea - SHR.....	36
1.3 Regulação autonômica do sistema Cardiovascular	37

2 OBJETIVOS

.....	43
2.1 Objetivos gerais	43
2.2 Objetivos específicos	43

3 MÉTODOS

.....	45
3.1 Animais	45
3.2 Implante dos eletrodos no seio carotídeo e canulação.....	45
3.3 Aquisição dos dados hemodinâmicos	46
3.4 Protocolos experimentais	47
3.4.1 Protocolo experimental 1 – Medida da resistência elétrica da preparação: eletrodos - seio carotídeo	47
3.4.2 Protocolo experimental 2 – Estimulação elétrica do seio carotídeo de ratos Wistar e SHR.	48
3.4.3 Protocolo experimental 3 – Estimulação crônica (2 dias) do seio carotídeo de SHR.	48
3.5 Reatividade vascular da artéria mesentérica isolada.....	49

3.5.1	Preparação da artéria mesentérica isolada	49
3.5.2	Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina	50
3.5.3	Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina na ausência do endotélio	50
3.5.4	Avaliação da resposta vasodilatadora a acetilcolina	50
3.5.5	Avaliação da resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio....	51
3.6	Análise espectral da pressão arterial e da frequência cardíaca	51
3.6.1	Análise simbólica da variabilidade do intervalo de pulso	52
3.7	Análise estatística	55

4 RESULTADOS

	57
4.1	Impedância elétrica do seio carotídeo	54
4.2	Respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo em diferentes frequências	53
4.3	Alterações hemodinâmicas observadas na estimulação elétrica prolongada (60 min) do seio carotídeo	60
4.4	Variabilidade da FC e PA observadas na estimulação elétrica prolongada do seio carotídeo	61
4.5	Alterações hemodinâmicas observadas na Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) à estimulação elétrica do seio carotídeo em SHR	63
4.6	Reatividade vascular da artéria mesentérica isolada.....	66
4.6.1	Avaliação da resposta relaxante dependente de endotélio.....	66
4.6.2	Avaliação da resposta relaxante independente de endotélio	68
4.6.3	Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina	70
4.6.4	Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina na ausência de endotélio	72

4.7 Efeito da estimulação crônica do seio carotídeo em animais hipertensos SHR sobre a variabilidade da FC e PA.....	73
--	----

5 DISCUSSÃO

.....	76
5.1 Caracterização das respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo à aplicação de diferentes parâmetros de estimulação em ratos Wistar e SHR	77
5.2 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial antes e após a estimulação elétrica contínua (60 min) do seio carotídeo em ratos Wistar e SHR	79
5.3 Respostas hemodinâmicas e vasculares à estimulação prolongada do seio carotídeo de animais SHR	79

6 CONCLUSÕES

.....	87
Estimulação elétrica prolongada do seio carotídeo de ratos hipertensos L-LAME.....	89

BIBLIOGRAFIA

.....	105
-------	-----

APÊNDICE

Apêndice 1 – Manuscrito	118
-------------------------------	-----

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, estando associada a 80% dos casos de acidente vascular cerebral (AVC) e a 60% dos casos de doenças isquêmicas do coração [OPAS 2003]. Há evidências suficientes de que, em indivíduos com níveis pressóricos normais, o aumento de 20 mmHg na pressão sistólica e 10 mmHg na pressão diastólica duplica o risco de morte por AVC e infarto do miocárdio [Chobanian e cols. 2003]. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA) a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente. A hipertensão tem alta prevalência e baixas taxas de controle, e é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública no Brasil e no mundo [Brasil 2006].

Segundo a Organização Mundial de Saúde, há pelo menos 600 milhões de pessoas hipertensas em todo o mundo [WHO 2003]. Trata-se de um fator de risco de alta prevalência afetando aproximadamente 35% dos brasileiros. No Brasil, as doenças cardiovasculares são uma das principais causas das internações hospitalares e cerca de um terço de todos os óbitos [Brasil 2006, Ministério da Saúde 2004]. Dentre os indivíduos hipertensos, existem alguns que apresentam uma incapacidade de redução da PA mesmo com mudanças no estilo de vida e em uso de doses ideais de três ou mais anti-hipertensivos de classes diferentes, incluindo um diurético, caracterizando o que conhecemos como hipertensão refratária ou resistente [Rossignol 2016]

1.1 Estimulação elétrica dos barorreceptores

O barorreflexo arterial é, sem dúvida, um dos principais mecanismos da regulação de curto prazo da PA, mantendo-a dentro de um estreito limite de variação. Este reflexo tem origem em mecanorreceptores localizados principalmente na aorta proximal e nos seios carotídeos, conhecidos como barorreceptores arteriais. Quando há estiramento desses receptores ocorre uma inibição reflexa da atividade simpática, além de uma potente estimulação da atividade eferente vagal (parassimpática) para o coração, fazendo com que a pressão sofra uma imediata redução.

A estimulação elétrica de aferências neurais dos barorreceptores é uma técnica que vem sendo muito utilizada em pacientes com hipertensão refratária. Essa técnica foi proposta como método de tratamento da hipertensão arterial no início dos anos 60, tendo em vista as limitações da terapia farmacológica da época para tratar a hipertensão. Estudos subsequentes mostraram que a estimulação prolongada do nervo do seio carotídeo (SC), reduzia a PA, cronicamente, em cães hipertensos [Griffith e Schwartz 1964, Neistadt e cols. 1967], e em pacientes com hipertensão refratária [Illig al 2006, Filippone e cols. 2007, Schmidli e cols. 2007, Tordoir e cols. 2007, Scheffers e cols. 2010, Gassler e cols. 2012, Alnima e cols. 2012; 2013]. Mais recentemente, estudos de Lohmeier e cols. [2005], realizados em cães normotensos acordados, demonstraram que a ativação elétrica prolongada do barorreflexo produziu queda substancial, e sustentada, da PA, e discreta redução da frequência cardíaca (FC), por supressão da atividade simpática e do sistema renina angiotensina. Em trabalhos recentes do mesmo laboratório a estimulação elétrica do SC produziu respostas semelhantes em cães com hipertensão induzida por infusão crônica de angiotensina II [Lohmeier e cols. 2005], obesos [Lohmeier e cols. 2007], ou mesmo normotensos com desnervação renal [Lohmeier e cols. 2007]. Atualmente, essa

técnica está sendo reconsiderada em humanos, e as dificuldades observadas nos estudos pioneiros parecem ter sido amenizadas com a utilização de recursos modernos para a confecção de eletrodos e geradores de pulso modernos (Sistema *Rheos*: Figura 1)

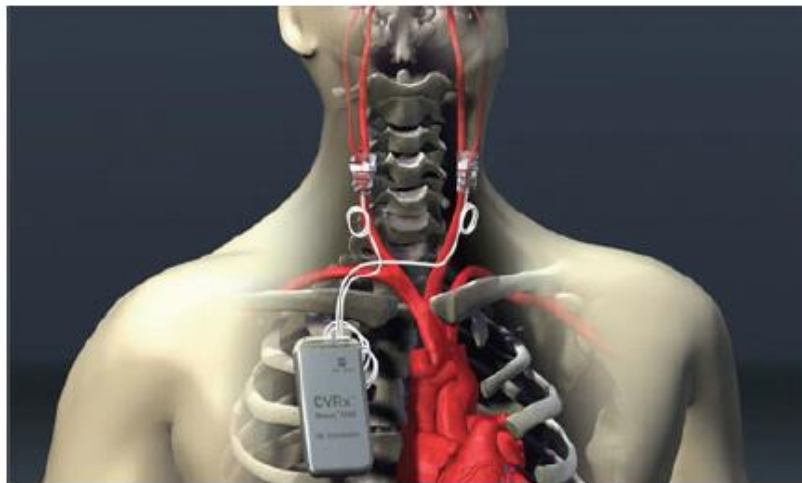


Figura 1 - Representação esquemática ilustrativa do sistema Rheos para estimulação elétrica do SC em pacientes com hipertensão arterial refratária ao tratamento farmacológico. Note o gerador de pulsos elétricos implantado no subcutâneo e os eletrodos de estimulação posicionados, bilateralmente, ao redor dos SC [adaptado de <http://www.cvr.com>].

Sabe-se que o sistema nervoso autônomo tem um importante papel na fisiopatologia da hipertensão arterial, e um dos mecanismos que determina o aumento da atividade simpática nessa doença é a redução da sensibilidade dos reflexos arteriais

e cardiopulmonares, que normalmente são reflexos inibitórios da função cardiocirculatória [Zucker e cols. 2006].

Estudos clínicos que utilizam a estimulação elétrica de barorreceptores carotídeos já estão em andamento, especialmente para o tratamento de pacientes hipertensos resistentes à terapia farmacológica [Illig e cols. 2006, Filippone e Bisognano, 2007, Schmidli e cols. 2007, Tordoir e cols. 2007, Scheffers e cols. 2010, Gassler e cols. 2102; Alnima e cols. 2013]. Esses estudos de estimulação elétrica aguda [Illig e cols. 2006, Schmidli e cols. 2007], ou prolongada [Tordoir e cols. 2007] dos barorreceptores carotídeos têm mostrado redução consistente da PA e FC, constituindo-se em uma técnica promissora para o tratamento da hipertensão arterial resistente à terapêutica farmacológica convencional. No estudo multicêntrico denominado DEBuT-HT (Device Based Therapy in Hypertension Trial), foram observados efeitos benéficos, apreciáveis, sobre a função cardíaca, decorrente da ativação elétrica do SC. Foram observadas, a saber, redução significativa do índice de massa ventricular esquerda, significativo aumento da fração de ejeção ventricular esquerda, redução do volume do átrio esquerdo, e redução da espessura do ventrículo esquerdo [Bisognano e cols. 2011]. Revisão recente de Georgakopoulos e cols. [2011] provê evidências claras do potencial terapêutico da ativação elétrica dos barorreceptores, por exemplo, para a melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Embora os mecanismos envolvidos na redução da PA pela estimulação elétrica do SC ainda não estejam completamente elucidados [Georgakopoulos e cols. 2011], a ativação do barorreflexo do SC, produz aumento da atividade parassimpática e redução da atividade simpática. Em estudo recente Zucker e cols. [2006] aplicaram

essa técnica, cronicamente, em cães com insuficiência cardíaca (IC), a fim de promover redução da hiperatividade simpática neste quadro fisiopatológico. Nesse estudo foi observado que a atenuação simpática, pela redução da noradrenalina e angiotensina II plasmáticas, induzidas pela estimulação elétrica do SC, aumentou a sobrevivência dos animais com IC. Entretanto, até o momento não existem estudos que utilizaram a estimulação elétrica, aguda ou crônica das aferências do barorreflexo (seio carotídeo) para promover o aumento da atividade vagal parassimpática para o coração e outros órgãos.

O nosso laboratório desenvolveu, recentemente, a técnica para a estimulação elétrica do SC em ratos acordados [Katayama e cols. 2015]. Tal estimulação é eficiente em produzir quedas da PA e bradicardia, de modo intensidade dependente, tanto em ratos normotensos como hipertensos. Tais respostas são mediadas pelos barorreceptores carotídeos, uma vez que são abolidas pela desnervação cirúrgica do SC [Katayama e cols. 2015]. A Figura 2 é uma representação ilustrativa do posicionamento do eletrodo bipolar ao redor do SC de ratos.

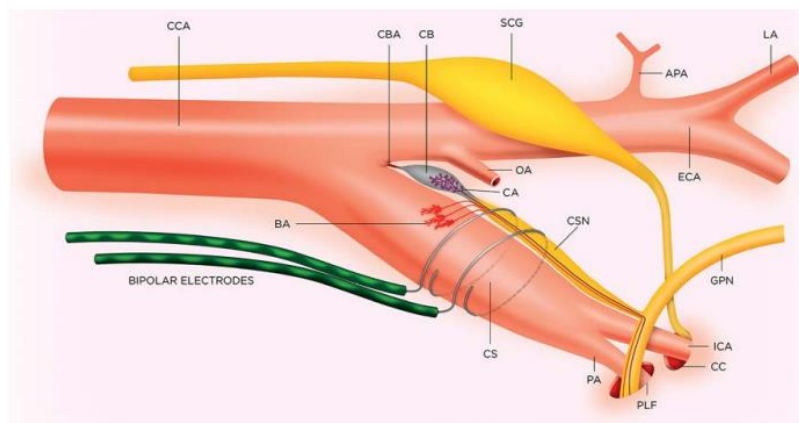


Figura 2 - Representação ilustrativa do implante do eletrodo bipolar ao redor do SC para estimulação crônica desta estrutura (modificado a partir de Katayama e cols. 2015).

1.2 Modelo de hipertensão espontânea - SHR

Modelos experimentais são valiosos instrumentos no auxílio da compreensão da fisiopatologia de doenças comumente encontradas entre os seres humanos. Diversos modelos de hipertensão arterial experimental são conhecidos, e, entre eles, o rato com hipertensão espontânea (SHR). Desde o seu desenvolvimento por Okamoto e Aoki em 1963 [Okamoto e Aoki 1963], o SHR, se não é o modelo mais estudado, certamente está entre os mais estudados para as doenças cardiovasculares [Trippodo e Frohlich 1981]. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão primária do homem. Este modelo tem se revelado bastante útil para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos, quer do próprio modelo em si, quer da hipertensão primária do homem.

Os SHR começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando uma elevação da PA, considerada como hipertensão espontânea, entre a 7^a e a 15^a semana, atingindo um platô por volta da 20^a semana de vida, não havendo influência sexual neste desenvolvimento [Yamori 1984]. Entretanto, fatores ambientais tais como, ingestão exagerada de sódio, estresse [Yamori e cols. 1969], alterações sociais [Hallback 1975], e alterações do ciclo claro/escuro [Lais e cols. 1974] afetam o desenvolvimento da hipertensão nesses ratos. A hipertensão do SHR adulto está associada a um aumento da resistência periférica total, com débito cardíaco normal [Judy e cols. 1976, Lundin e cols. 1984]. Foi demonstrado, ainda, um aumento da resistência venosa, e uma notável hiperatividade simpática [Pfeffer e Frohlich 1973] em SHR.

A importância dos fatores neurais no desenvolvimento do SHR foi demonstrada por meio da redução da PA em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica de nervos

simpáticos, prevenção do desenvolvimento da hipertensão por imuno-simpatectomia, simpatectomia química e outros métodos [Trippodo e Frohlich 1981]. Existe, portanto, uma ampla documentação de uma hiperatividade simpática no SHR.

1.3 Regulação autonômica do sistema Cardiovascular

É conhecido que os parâmetros cardiovasculares, como a PA e FC, possuem certa variabilidade espontânea. Avaliações da variabilidade da PA, FC e da sensibilidade barorreflexa têm ganhado muita importância, uma vez que as mesmas refletem a modulação autonômica sobre o coração [Malliani e cols. 1991]. Reduções na variabilidade da FC e na sensibilidade do barorreflexo arterial são preditoras de morbidade e mortalidade em várias doenças cardiovasculares, como: infarto agudo do miocárdio [Kleiger e cols. 1987], insuficiência cardíaca [Binkley e cols. 1991], hipertensão arterial [Guzzetti e cols. 1991], entre outras. Ainda, o aumento na variabilidade da PA está associado a lesões em órgãos alvo e aumento do risco cardiovascular [Parati e cols. 1987a, Parati e cols. 1987b, Zanchetti e Mancia 1987, Mancia e cols. 1999]. A análise da variabilidade cardiovascular tem permitido quantificar, com relativa acuidade, a participação da modulação simpática e parassimpática sobre a atividade cardíaca e vasomotora, em condições fisiológicas e fisiopatológicas [Malliani e cols. 1991b, Task Force 1996, Mésangeau e cols. 2000].

Assim, baseando-se em observações muito relevantes e amplamente aceitas, podemos afirmar que o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um instrumento valioso para avaliação da regulação neural cardiovascular, tanto em nível clínico, como experimental [Malliani e cols. 1991, Task Force 1996]. A FC instantânea,

medida, por exemplo, pela duração entre sucessivas ondas R (intervalo RR), apresenta certa variabilidade natural (Figura 3).

Variabilidade da FC é o termo utilizado para descrever a variabilidade entre sucessivos valores de intervalo cardíaco (ou FC instantânea), e pode ser analisada tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência (análise espectral). A análise da VFC no domínio do tempo extrai características estatísticas das séries de sucessivos valores do intervalo cardíaco (séries temporais ou tacograma).

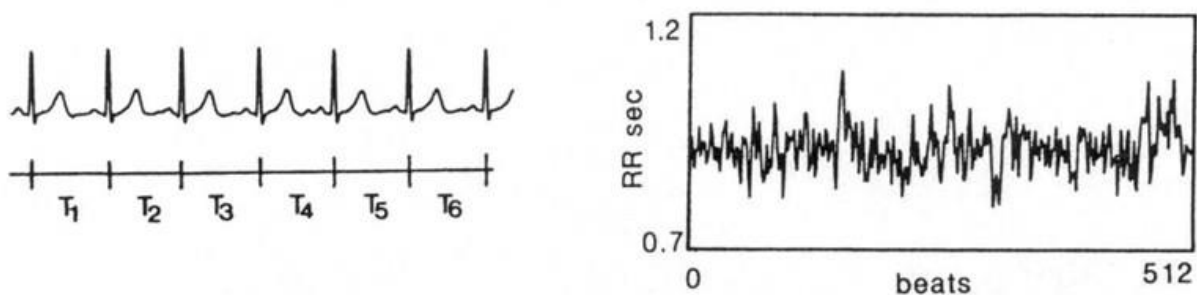


Figura 3: Registro eletrocardiográfico [esquerda] de um indivíduo normal, com a marcação dos intervalos entre sucessivas ondas R (T1 a T6). [direita] valores de 512 sucessivos intervalos RR (tacograma) de um indivíduo normal (modificada de [Furlan e cols. 1990](#)).

A análise da VFC no domínio da frequência, cujo método de análise mais conhecido é a análise espectral da FC, baseia-se na identificação e quantificação de ritmos presentes em séries temporais de intervalo cardíaco (figura 4). As diferenças funcionais entre os dois componentes do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático) induzem diferentes ritmos na variabilidade do intervalo cardíaco que só

são evidenciadas quando esses parâmetros são expressos no domínio da frequência (espectros) [Akselrod e cols. 1985]. Tem sido amplamente demonstrado que o estado de equilíbrio da modulação simpato-vagal cardíaca pode ser avaliado através do estudo dos ritmos presentes em séries temporais de intervalo cardíaco [Malliani and Pagani 1991, Malliani e cols. 1991]. Além disso, a análise espectral possui a capacidade de expressar o balanço simpato-vagal, tanto em situações de repouso, como também em resposta a estímulos excitatórios, auxiliando na caracterização da modulação neural cardíaca em diversos estados fisiológicos e fisiopatológicos. Assim, a análise espectral da FC é uma ferramenta confiável, segura e reprodutível, possibilitando um bom entendimento da participação do controle autonômico, simpático e parassimpático, sobre o nó sinusal tanto em indivíduos saudáveis, como em portadores de diversas doenças.

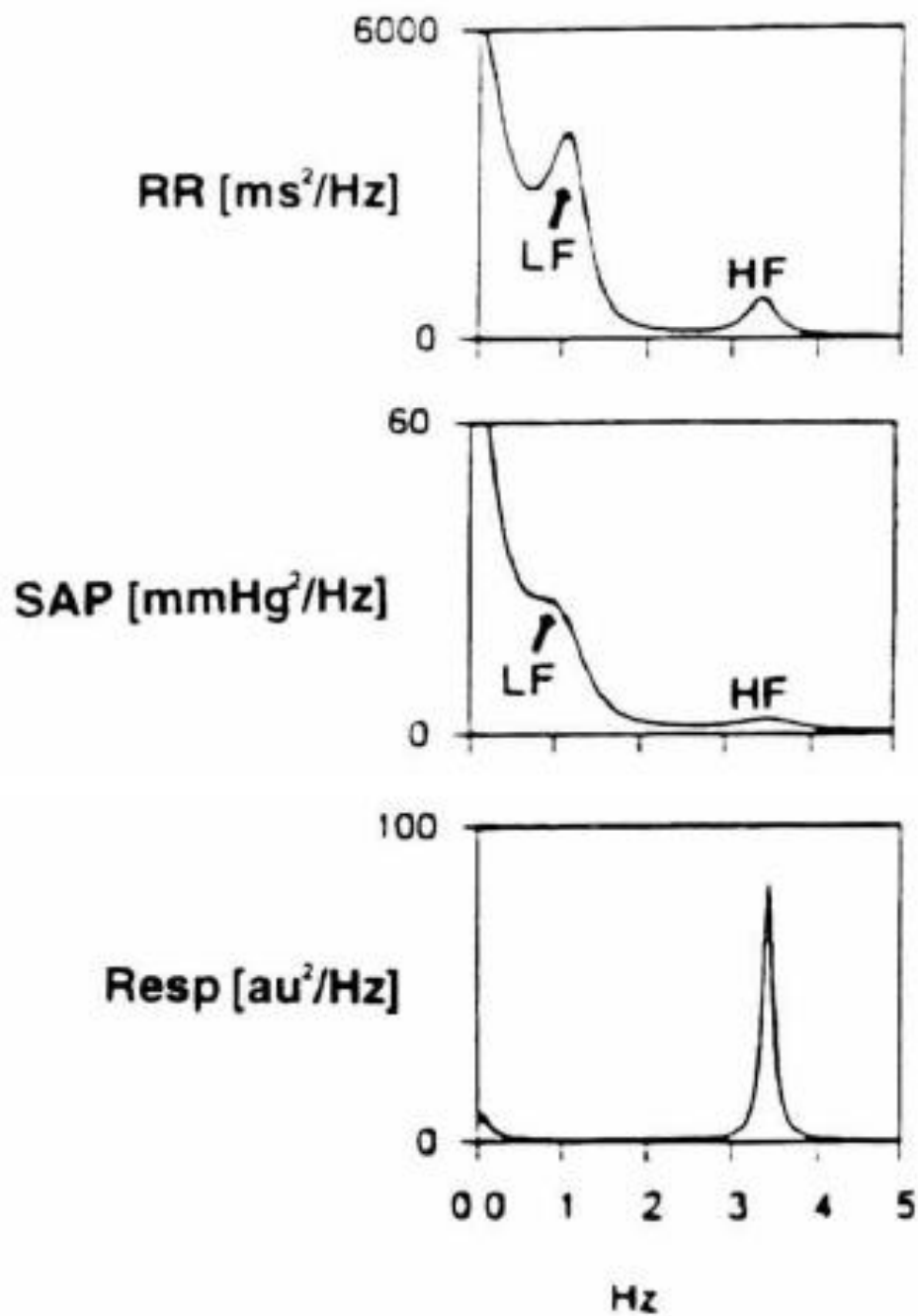


Figura 4 - Espectros ilustrativos do intervalo RR (painel superior), pressão arterial sistólica (PAS, painel intermediário) e da atividade respiratória (painel inferior), mostrando os componentes oscilatórios principais (LF e HF), encontrados na FC e na PA (modificada de [Montano e cols. 1998](#)).

Sendo assim, a abordagem das técnicas de VFC e PA têm permitido examinar a modulação simpática sobre o sistema cardiocirculatório, particularmente em condições fisiopatológicas, como a hipertensão arterial, em pacientes [[Guzzetti e cols. 1988](#)] e em animais de experimentação (modelos de hipertensão) [[Wang e cols. 2005](#)].

Com base nos argumentos expostos, hipotetizamos que a estimulação elétrica do SC seria capaz de promover alterações hemodinâmicas e vasculares, bem como na modulação autonômica cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar respostas cardiovasculares à estimulação elétrica, aguda e crônica, do SC em ratos acordados, normotensos ou SHR.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar e avaliar as respostas da estimulação elétrica do SC com diferentes frequências, em ratos normotensos ou SHR.

Avaliar os efeitos hemodinâmicos da estimulação prologada (60 min) do SC. Para tanto, aplicamos os estímulos de modo contínuo ou intermitente (20/20s ON/OFF), em animais normotensos ou SHR.

Avaliar as repercussões hemodinâmicas, bem como, sobre a variabilidade da FC e PA, além das respostas vasculares (em vaso de resistência) da estimulação elétrica do SC aplicada cronicamente, durante 2 dias, ao SC de SHR.

Métodos

3 MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP: Protocolo n. 023/2013).

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar e SHR, com aproximadamente 300 g, com 15 a 18 semanas de idade. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas e todo o material implantado nos ratos foi devidamente esterilizado.

3.2 Implante dos eletrodos no seio carotídeo e canulação arterial

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg, ip União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, ip Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e, com o auxílio de um microscópio cirúrgico (M902MFZ, DFV Com. Ind. Ltda, São Paulo, SP), tiveram o SC esquerdo identificado, cuidadosamente isolado, envolvido por um par de eletrodos e isolado das estruturas vizinhas por resina que polimeriza a frio (Kwik-Sil, World Precision Instruments Inc., Sarasota, Flórida, USA). Fios flexíveis, conectados aos eletrodos foram exteriorizados na região interescapular dos ratos para posteriormente serem conectados a um estimulador elétrico.

Nos animais que receberam o estímulo elétrico crônico (48 h) os eletrodos ao redor do SC foram conectados a um gerador miniaturizado e portátil, alimentado por bateria e

operado remotamente, que foi implantado no tecido subcutâneo do dorso dos ratos (Figura 5). Esses geradores implantáveis foram projetados e construídos no nosso laboratório.



Figura 5 - Fotografia de um estimulador elétrico portátil implantável para estimulação crônica do SC de ratos.

Após o implante dos eletrodos ao redor do SC, os ratos receberam um cateter de polietileno (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) na artéria femoral esquerda para registro direto da PA.

Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam antibiótico veterinário (Benzilpenicilina, 0,7 mg/kg im) para animais de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP, Brasil) e analgésico (Flunixin Meglumina, 2,5 mg/kg, s.c.).

3.3 Aquisição dos dados hemodinâmicos

Após 24 horas de recuperação da cirurgia foi realizado um registro basal da PA cuja duração variou de acordo com cada protocolo experimental. No protocolo de estimulação curta os registros basais duraram 15 minutos, já no protocolo de estimulação crônica tiveram duração de 60 minutos. Para isso, os ratos foram conectados ao sistema

de registro, o qual consiste de um transdutor de pressão (MLT844; ADInstruments, Sydney, Austrália) ligado a um amplificador de sinais (Amplificador ML110, ADInstruments, Sidney, Austrália). Com o auxílio de um computador acoplado ao conversor analógico-digital PowerLab (ML866/P; ADInstruments, Sydney, Austrália), o sinal da PAP (pressão arterial pulsátil) foi digitalizado (1 kHz) e, a partir dele, obtida a pressão arterial média (PAM) e a FC. Os parâmetros cardiovasculares foram monitorados durante todo o experimento, de acordo com o protocolo experimental [Domingos-Souza e cols. 2016].

3.4 Protocolos experimentais

3.4.1 Protocolo experimental 1 – Medida da resistência elétrica da preparação: eletrodos - seio carotídeo.

Inicialmente, um grupo de ratos Wistar (n=14) foi utilizado para a medida da resistência elétrica da preparação: eletrodo - SC. Para isso, os ratos tiveram os eletrodos do SC conectados simultaneamente, em paralelo, a um gerador de pulsos elétricos de corrente controlada (AVS Projetos Especiais, São Carlos, SP) e um osciloscópio (Agilent, DSO3062A/MHz). Então, pulsos de onda quadrada com intensidade controlada de 1 mA, duração de 5 ms e frequência de 10 Hz foram aplicados ao SC por aproximadamente 1 min. A tensão gerada no SC dos ratos foi medida pelo osciloscópio e a resistência elétrica da preparação foi calculada (Figura 6). Esse procedimento foi repetido por 10 dias consecutivos.

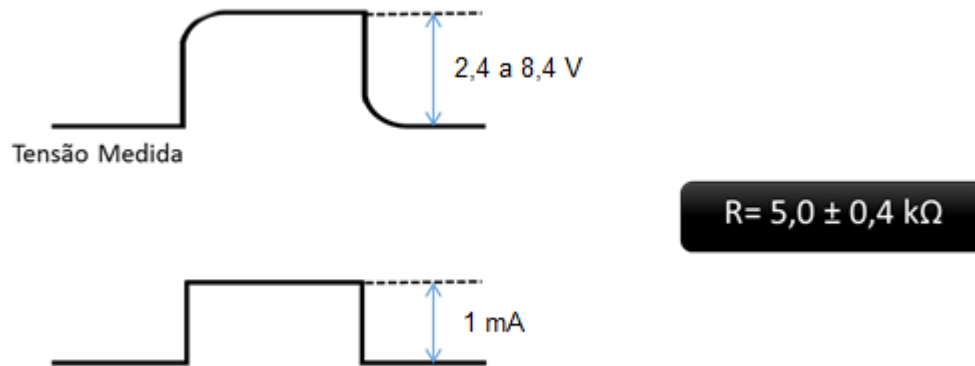


Figura 6 – Esquema representativo de como foram aferidos os dados de impedância do SC ao longo de 10 dias. A resistência elétrica foi calculada de acordo com a fórmula: $U=R.i$ (Lei de Ohm, onde U = tensão, R = resistência elétrica, i = corrente).

3.4.2 Protocolo experimental 2 – Estimulação elétrica do seio carotídeo de ratos Wistar e SHR.

No dia seguinte aos procedimentos cirúrgicos, os animais tiveram a PAP basal registrada (15 minutos) e a seguir o SC estimulado por curtos períodos (20 s) com pulsos de onda quadrada com 1 mA de intensidade, 1 ms de duração, nas frequências de 15, 30, 60 e 90 Hz, aplicadas em ordem randomizada. Pelo menos 5 minutos foram aguardados entre cada estimulação, para que os parâmetros hemodinâmicos retornassem completamente aos valores basais. Então, após o conjunto de estimulações curtas, o SC foi estimulado com pulsos de mesma intensidade e duração, na frequência de 30 Hz, durante 60 min. No dia seguinte, o protocolo foi repetido, entretanto a estimulação prolongada (60 min) foi aplicada de forma intermitente, ou seja, alternando períodos de 20 segundos com o estimulador ligado e 20 segundos com ele desligado (20/20 s ON/ OFF).

3.4.3 Protocolo experimental 3 – Estimulação crônica (2 dias) do seio carotídeo de SHR.

No dia seguinte ao implante do gerador, imediatamente antes deste ser ligado, foi feito um registro basal de PAP e FC por 1 hora. Neste protocolo, os estimuladores foram programados para aplicar estimulação intermitente, com ciclos de duração de 20 segundos ON e 20 segundos OFF, com pulsos de onda quadrada com 3 Volts de tensão, 1 ms de duração e frequência de 30 Hz. Após 2 dias, o gerador foi desligado e novamente a PA e FC foi registrada durante uma hora. Por fim, os animais foram decapitados e o leito mesentérico foi isolado e coletado para estudos de reatividade vascular.

3.5 Reatividade vascular da artéria mesentérica isolada

3.5.1 Preparação da artéria mesentérica isolada

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern [1977]. Após decapitação, o leito mesentérico foi removido, segmentos de artérias mesentéricas medindo aproximadamente 2 mm de comprimento foram montados em um miógrafo para pequenos vasos (Danish Myo Tech, modelo 620M, A/S, Aarhus, Dinamarca) onde foram introduzidos dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) através do lúmen dos segmentos de artéria mesentérica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permitia o estiramento da artéria. Este miógrafo estava conectado a um sistema de aquisição de dados (Danish Myo Tech Powerlab 8-30/P, ADInstruments, Sydney, Austrália) e este a um computador. Uma vez montadas, as artérias foram mantidas em solução Krebs Henseleit [em mM: (NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄

1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; CaCl₂ 1,6], a uma temperatura constante de 37°C e gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), pH 7,4. As preparações de artéria mesentérica foram normalizadas até atingirem uma tensão de 13,3 kPa e permaneceram em repouso durante 30 minutos para estabilização. Em seguida, as artérias foram contraídas com solução Krebs contendo alta concentração de Potássio (120 mM) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos. Após o retorno das artérias a sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio funcional através da capacidade da acetilcolina (Sigma-Aldrich - 10⁻⁵ M) produzir relaxamento em artérias previamente contraídas com fenilefrina (Sigma-Aldrich Phe, 10⁻⁶ M). Foram considerados segmentos com endotélio funcional aqueles que apresentaram relaxamento maior que 80% em resposta a acetilcolina. Após novo período de estabilização, foram iniciadas as curvas concentração-resposta.

3.5.2 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes de Fenilefrina (10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

3.5.3 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina na ausência do endotélio

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio (ausência – retirado mecanicamente com o auxílio de um fio de cabelo humano), as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes de fenilefrina (10⁻¹⁰ a 10⁻⁴ M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

3.5.4 Avaliação da resposta vasodilatadora a acetilcolina

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com fenilefrina (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal) nas preparações. Foram realizadas a estimulação com um análogo da tromboxana (U 46619, 10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de acetilcolina (ACh, 10^{-10} a 10^{-4} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

3.5.5 Avaliação da resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio

Após a realização do teste de viabilidade da preparação e funcionalidade do endotélio, as preparações foram estimuladas com Fenilefrina (10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal) nas preparações. Foram realizadas a estimulação com um análogo da tromboxana (U 46619, 10^{-6} a 3×10^{-6} M) para produzir pré-contracção (ou aumento da tensão basal). Após 15 minutos do início da pré-contracção, a artéria mesentérica foi estimulada com concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-12} a 10^{-5} M) gerando uma curva concentração-resposta cumulativa.

3.6 Análise espectral da pressão arterial e da frequência cardíaca

A variabilidade da PA sistólica e da FC foi analisada por meio de um programa computacional de uso livre (CardioSeries: disponível na rede mundial de computadores - <http://sites.google.com/site/cardioseries>) desenvolvido no Departamento de Fisiologia da FMRP. No estímulo do SC com 60 min de duração, a análise da variabilidade foi realizada nos 5 min que antecederam a estimulação e nos últimos 5 min de estímulo do SC. Para a

análise da variabilidade nos animais que receberam 48 h de estímulo, foram selecionados períodos de 60 minutos de registros basais e após o período de estimulação (imediatamente após o estimulador ser desligado). Cada trecho teve os valores de intervalo de pulso (IP) e PA sistólica reamostrados em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PA foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch).

A estacionariedade dos valores de IP e PA sistólica de cada segmento foi examinada visualmente e aqueles com artefatos ou transientes, foram excluídos. Cada segmento de IP e PA teve seu espectro calculado pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento do tipo Hanning. Os espectros de IP foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 - 3,0 Hz), com os resultados expressos em valores absolutos (ms^2) e unidades normalizadas (un), enquanto que os espectros de PA sistólica foram integrados somente na banda de baixa frequência (LF: 0,2 - 0,75 Hz), com os resultados expressos em valores absolutos (mmHg^2). Os valores normalizados foram obtidos através do cálculo da porcentagem da potência de LF e HF com relação à potência espectral total, menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF: $< 0,2$ Hz). Adicionalmente, a razão LF/HF também foi calculada para avaliação do balanço simpato-vagal sobre o coração.

3.6.1 Análise simbólica da variabilidade do intervalo de pulso

A variabilidade do IP também foi analisada por meio do método não linear denominado análise simbólica. Este método classifica as alterações entre sucessivos valores do IP por meio de padrões de símbolos [Guzzetti e cols. 2005; Porta e cols. 2001,

2007]. Para isso, foi utilizado outro programa computacional de uso livre chamado JBios [Sabelli e Lawandow 2010]. Séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP tiveram os valores máximos e mínimos determinados. Em seguida, utilizando-se estes valores previamente detectados (máximo e mínimo), os valores de IP foram distribuídos em 6 faixas de igual tamanho, às quais contemplam toda a faixa de variação dos valores da série temporal. Mantendo a distribuição cronológica original dos valores na série temporal, o programa computacional inspecionou sequências de 3 batimentos (com sobreposição dos últimos 2 batimentos da sequência anterior) em busca de alterações entre os valores, evidenciadas por mudanças nas faixas em que se encontravam os pontos. Este método permite a identificação de três tipos de variação, entre os valores, nas sequências de 3 batimentos: nenhuma variação (0V), uma variação (1V) ou duas variações (2UV ou 2LV).

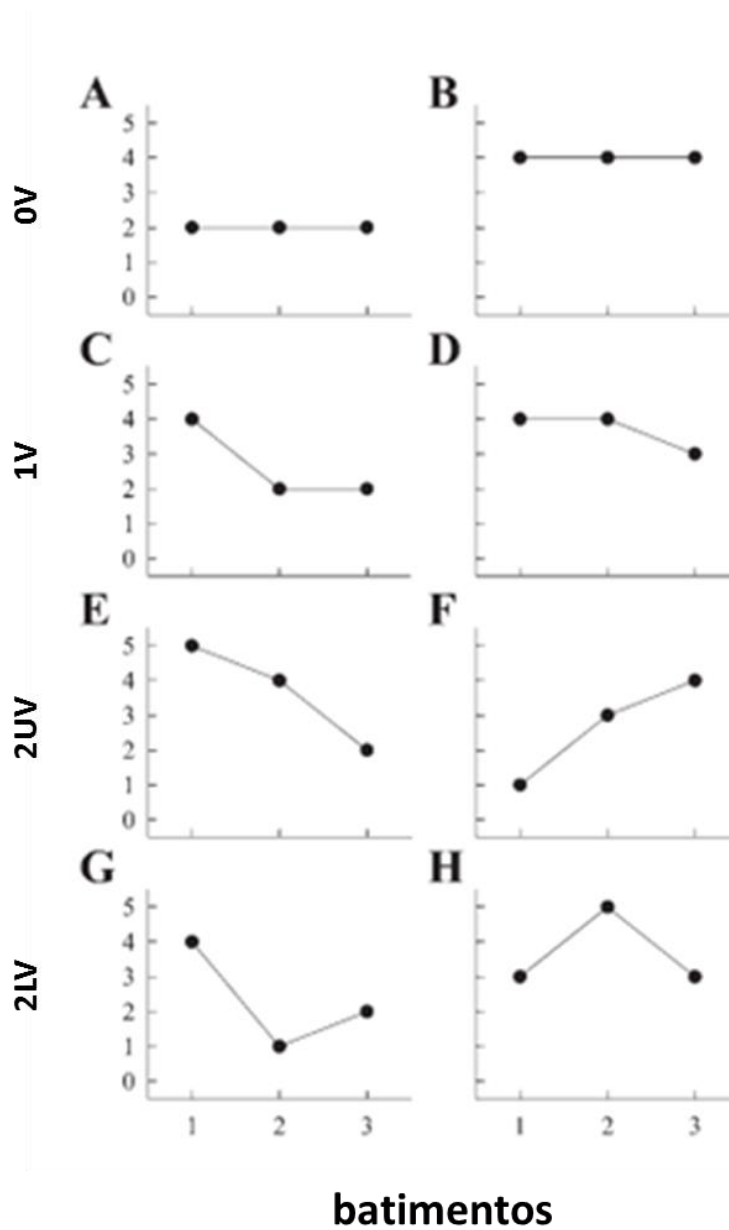


Figura 7 - Exemplos representativos dos diferentes padrões de variação utilizados na análise simbólica da variabilidade cardiovascular. Zero ou nenhuma variação (0V: painéis A e B), uma variação (1V: painéis C e D), padrões com 2 variações na mesma direção (2LV: painéis E e F) e padrões com duas variações em direções opostas (2UV: painéis G e H) (modificada de [Porta e cols. 2007](#)).

3.7 Análise estatística

Os valores de estimulação do SC em diferentes frequências foram comparados entre grupos usando análise de variância de uma via (“one way” ANOVA). Quando diferenças foram encontradas, os dados foram comparados aos pares pelo teste de Newman-Kews.

Os valores de estimulação do SC ao longo do tempo foram comparados entre grupos usando análise de variância de duas vias (“two way” ANOVA). Quando diferenças foram encontradas, os dados foram comparados aos pares pelo teste de Newman-Kews. As mesmas variáveis foram comparadas antes e após a estimulação.

Em relação às análises de reatividade vascular, as curvas concentração-efeito individuais à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio e fenilefrina foram plotadas de forma semi-logarítmica. Estas curvas, por sua vez, fornecem a pD2 (definida como o logaritmo negativo dos valores de EC50 – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima. Os valores de pD2 e de resposta máxima foram comparados por meio do teste t de Student. O programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, bem como para a construção das curvas sigmóides.

Os índices de variabilidade, analisados nos SHR (domínio do tempo, domínio da frequência e análise simbólica) da PA sistólica e também do IP foram comparados antes e após o período de estimulação pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Impedância elétrica do seio carotídeo

A corrente de 1 mA, aplicada ao SC gerou neste uma tensão que variou entre 2,4 e 8,4 V nos 14 ratos avaliados (média = $5,0 \pm 0,4$ V) e se manteve estável, em todos os ratos, ao longo dos 10 dias avaliados. Desse modo, a resistência elétrica média dessa preparação foi de $5,0 \pm 0,4$ K Ω .

4.2 Respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo em diferentes frequências

A Figura 8 ilustra traçados representativos das alterações hemodinâmicas da PAM e FC frente a aplicação de estímulos curtos (20 s) do SC em ratos normotensos ou hipertensos SHR.

Os SHR apresentaram PAM mais elevada (178 ± 4 mmHg) que a dos ratos normotensos (103 ± 3 mmHg), enquanto a FC foi similar em ambos os grupos (346 ± 16 e 369 ± 8 bpm em Wistar e SHR, respectivamente). A estimulação elétrica do SC provocou uma pronta diminuição da PA, acompanhada de bradicardia, tanto em ratos normotensos como hipertensos. A Figura 9 ilustra as respostas máximas de PA média e FC observadas durante as estimulações elétricas do SC de ratos normotensos (Wistar) e SHR. A resposta hipotensora dos SHR foi mais acentuada ($\Delta = -16$ a -48 mmHg, $n=14$) quando comparada à hipotensão dos animais normotensos ($\Delta = -19$ a -28 mmHg, $n=10$) na estimulação com diferentes frequências (15, 30, 60 e 90 Hz). Apenas nos SHR, a resposta hipotensora à estimulação do SC seguiu um padrão dependente da frequência de estimulação utilizada.

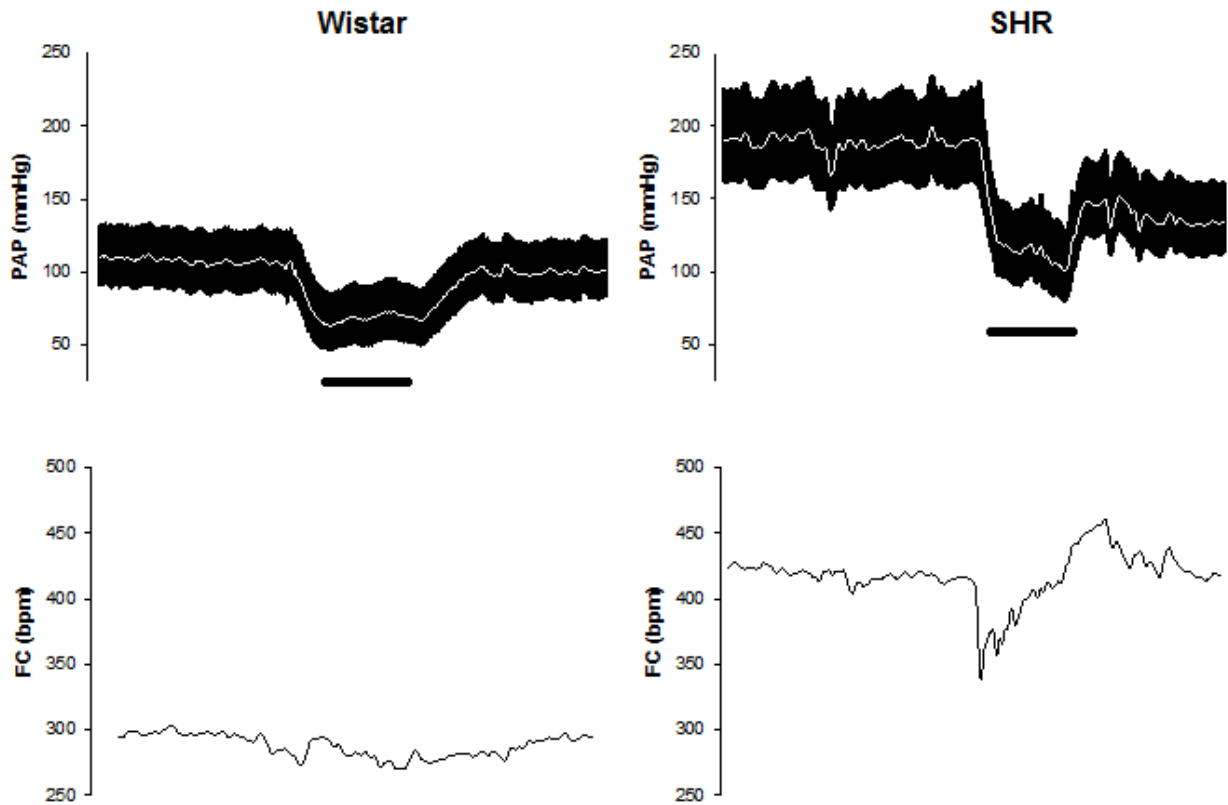


Figura 8 – Traçados representativos mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP) (painel superior), pressão arterial média (linha branca) e frequência cardíaca (FC) (painel inferior) em resposta a estimulação elétrica curta (20 s) do SC (1 mA, 1 ms e 60Hz) de animais acordados, normotensos e SHR. As barras pretas representam os 20 s de estimulação.

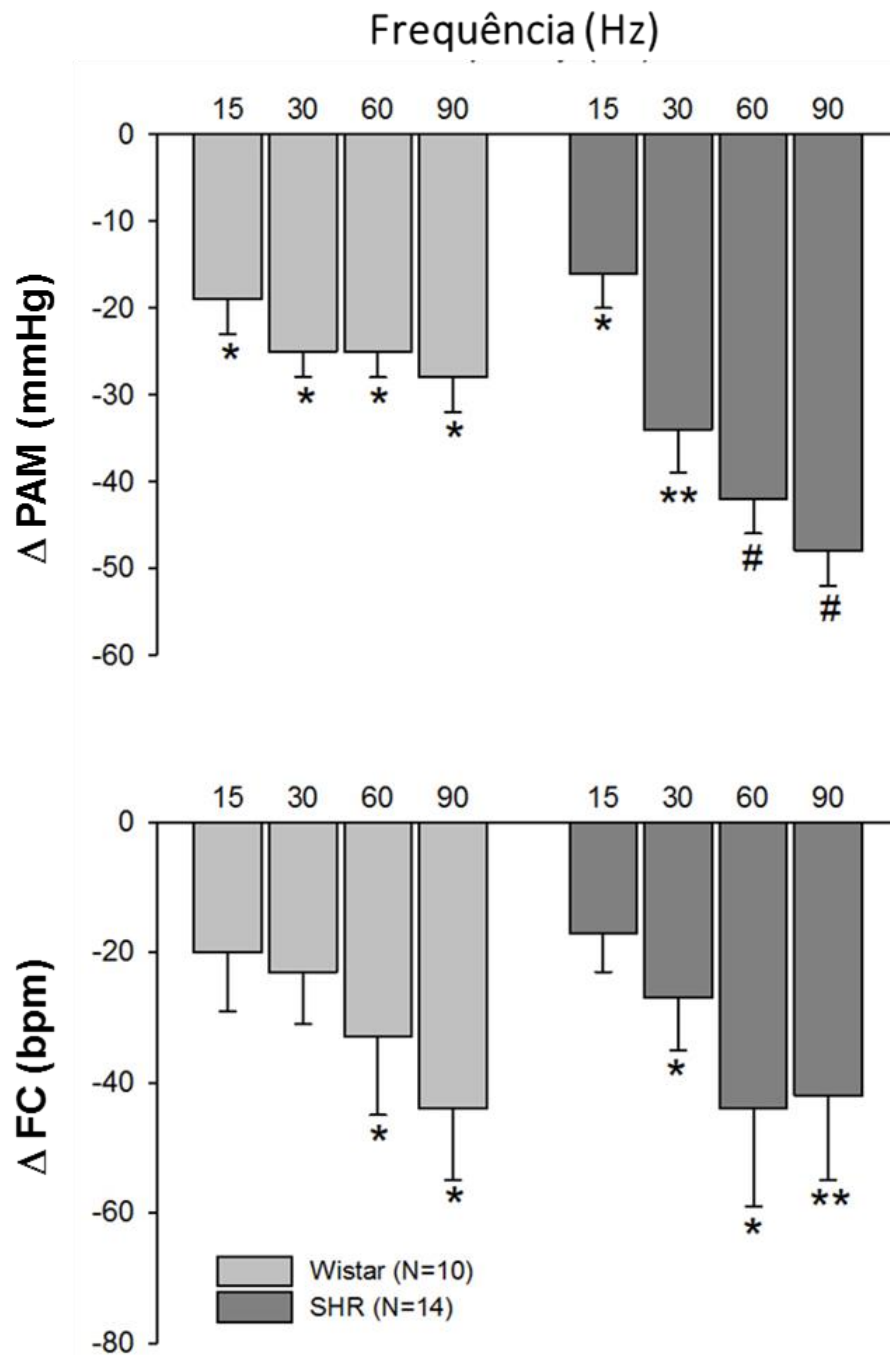


Figura 9 - Alterações (Δ) da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) observadas durante as diferentes frequências de estimulação (15, 30, 60, 90 Hz) do SC (20 s) em ratos Wistar (N = 10) ou SHR (N = 14). * $P < 0,05$ comparado com basal. ** $P < 0,05$ comparado com 15 Hz. # $P < 0,05$ comparado com 30 Hz.

4.3 Alterações hemodinâmicas observadas na estimulação elétrica prolongada (60 min) do seio carotídeo

A Figura 10 ilustra as alterações da PA média e FC observadas durante a estimulação prolongada (60 min), aplicada de forma contínua ou intermitente (20/20s ON/OFF) ao SC de ratos normotensos ou SHR. Os dois tipos de estímulos aplicados promoveram quedas sustentadas na PA em ambos os grupos durante todo o período de estímulo, porém não houve diferença quando comparados o estímulo contínuo vs. intermitente. Assim como nas estimulações de curta duração (20 s), os SHR apresentaram maior resposta hipotensora (resposta máxima) quando comparados aos ratos normotensos ($\Delta = -38 \pm 9$ vs. -15 ± 5 mmHg, respectivamente). Não foi observada diferença na resposta bradicárdica entre os grupos.

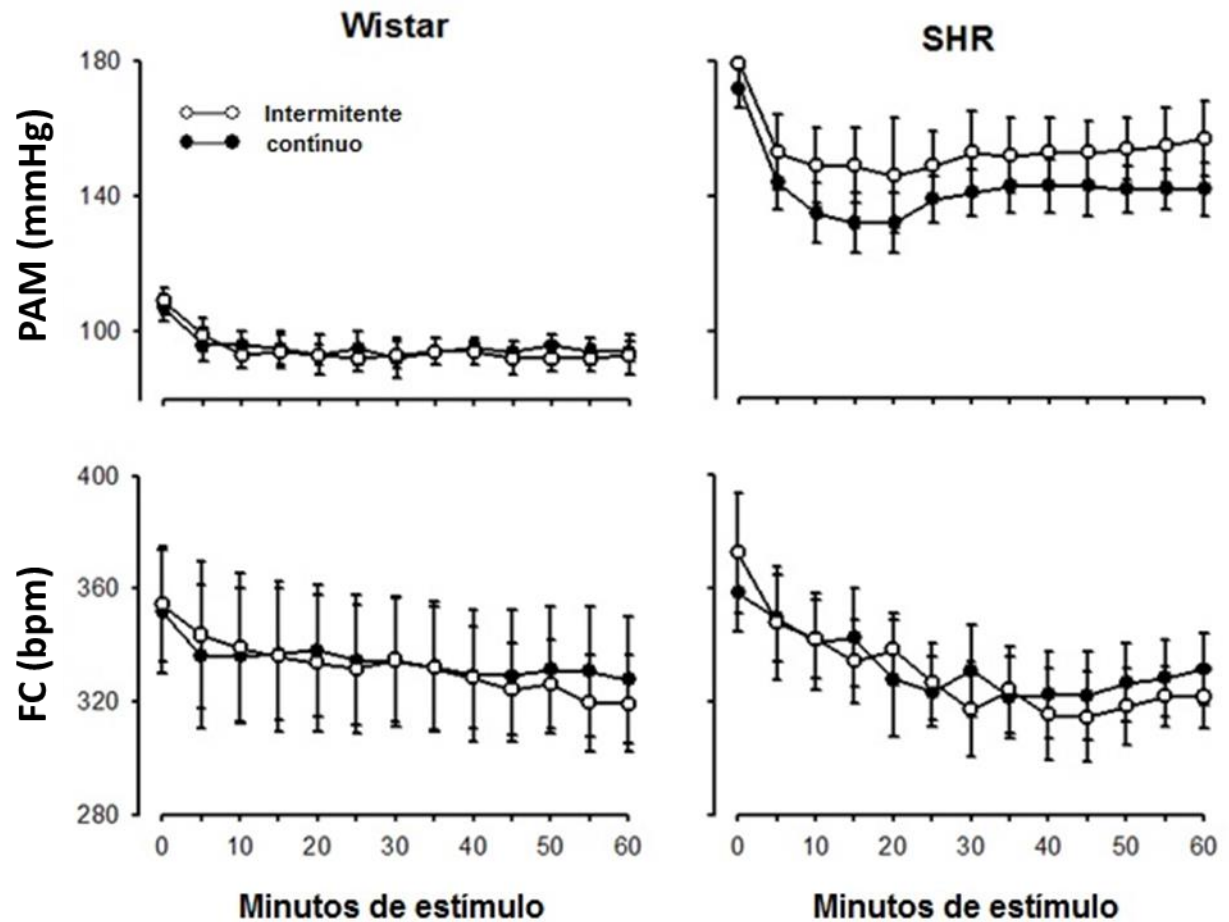


Figura 10 - Alterações hemodinâmicas da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) observadas durante 60 min de estimulação contínua (círculos pretos) ou intermitente (círculos brancos) do SC (1mA, 1ms, 30 Hz) em ratos Wistar (N = 10) ou SHR (N = 14), todos os valores de $p < 0,05$ comparado com tempo 0 (antes da estimulação) na PAM.

4.4 Variabilidade da FC e PA observadas na estimulação elétrica prolongada do seio carotídeo

A Tabela 1 apresenta os dados de variabilidade da FC e da PA antes e durante (5 min finais) a estimulação elétrica prolongada (60 min) do SC em ratos normotensos ou SHR. A estimulação promoveu aumento na ocorrência de sequências de IP do tipo de 2UV (37 ± 3 vs. $45 \pm 4\%$) e também diminuição da potência do espectro da PA na banda de LF (3.6 ± 0.3 vs. 0.7 ± 0.1) em ratos Wistar.

Tabela 1 – Efeitos da estimulação elétrica do SC durante 60 min (1 mA, 1 ms, 30 Hz) sobre a variabilidade da FC e PA em ratos Wistar e SHR.

	Wistar (N = 5)		SHR (N = 9)	
	Basal	Estímulo	Basal	Estímulo
Variabilidade FC				
SDNN, ms	6.4 ± 1.6	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.6	5.7 ± 0.6
RMSSD, ms	5.4 ± 0.5	6.1 ± 0.9	4.6 ± 0.5	6.0 ± 1.0
LF, nu	17.2 ± 4.6	7.4 ± 1.4	19 ± 2.7	18 ± 2.2
HF, ms ²	7.8 ± 2.0	9.5 ± 2.6	7.7 ± 1.0	14.1 ± 4.2
LF/HF	0.20 ± 0.07	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.05	0.24 ± 0.04
0V, %	16 ± 2	11 ± 2	18 ± 2	15 ± 1
2UV, %	37 ± 3	$45 \pm 4^*$	33 ± 2	35 ± 2
Variabilidade PA				
SD, mmHg	6.7 ± 0.5	6.0 ± 1.4	7.3 ± 0.8	7.8 ± 0.6
LF, mmHg ²	3.6 ± 0.3	$0.7 \pm 0.1^*$	6.8 ± 1.7	3.5 ± 0.8
0V, %	36 ± 4	24 ± 3	32 ± 6	29 ± 6

Valores de média \pm EPM. SDNN: desvio padrão dos intervalos de pulso, RMSSD: raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de intervalo de pulso, LF e HF: potência do espectro nas bandas de baixa e alta frequência, respectivamente. 0V: % de sequências com zero variações. * $p < 0.05$ comparados com basal.

4.5 Alterações hemodinâmicas observadas na pressão arterial e frequência cardíaca à estimulação elétrica crônica do seio carotídeo em SHR

A Figura 11 mostra a PA e FC observadas durante 48 horas de estimulação do SC de ratos hipertensos SHR acordados. A PA média basal dos SHR foi de 173 ± 5 mmHg. Logo que o dispositivo de estimulação foi ligado, promoveu uma queda acentuada ($\Delta = -33 \pm 4$ mmHg) na PA. A PA média registrada durante os primeiros 60 minutos após o desligamento do dispositivo, ainda se manteve inferior ($\Delta = -23 \pm 3$ mmHg) em relação aos seus valores basais. A FC basal foi de 285 ± 16 bpm, mas observamos que a estimulação promoveu uma resposta bradicárdica apenas no primeiro dia de estimulação ($\Delta = -60 \pm 19$ bpm).

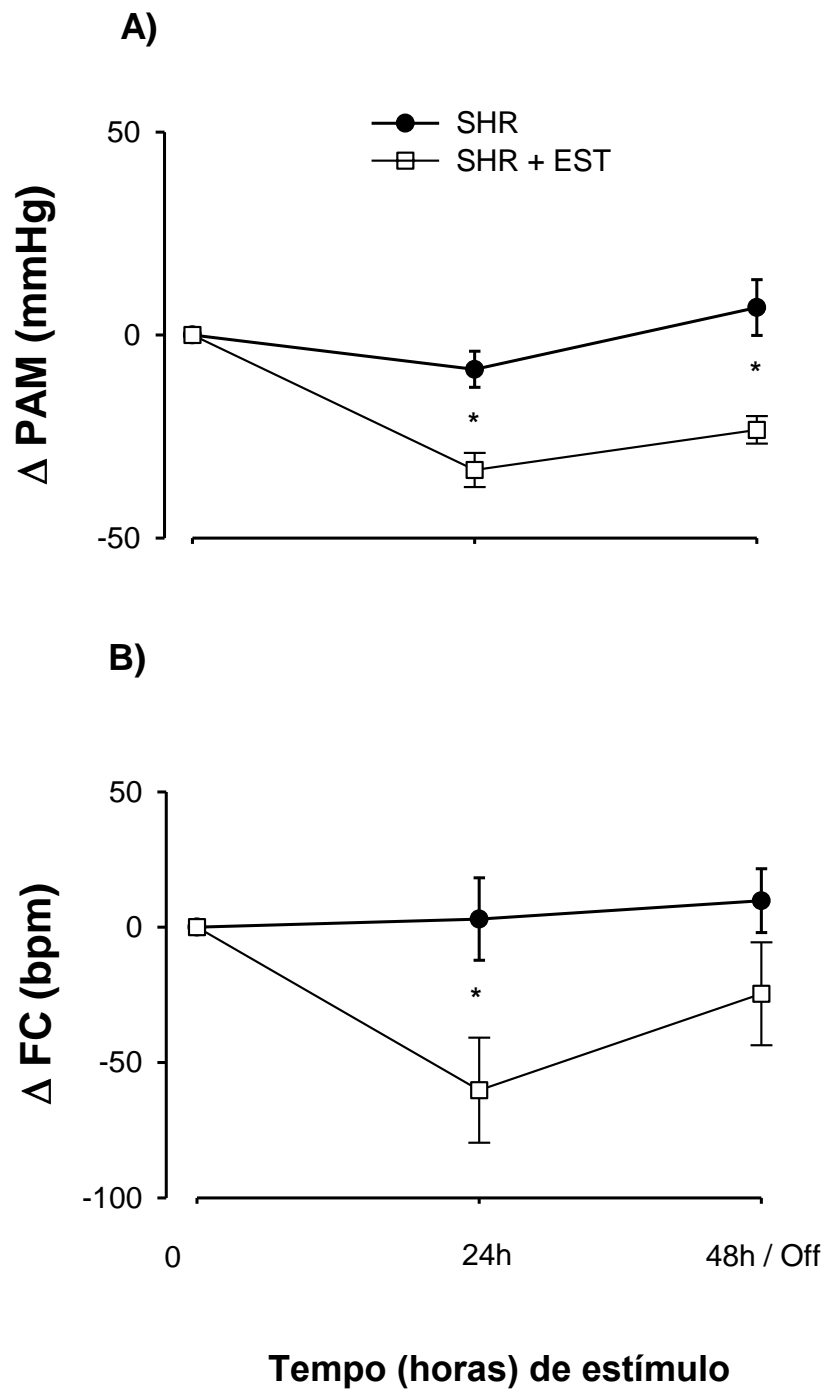


Figura 11 - Alterações hemodinâmicas em delta (Δ) de variação da pressão arterial média (PAM) (painel A) e frequência cardíaca (FC) (painel B) observadas durante a estimulação crônica do SC (48 h) em SHR. * $P < 0,05$ (N = 10).

Estão ilustrados na Figura 12 os traçados típicos representativos da pressão arterial pulsátil PAP, PAM e FC, em um rato hipertenso controle e em outro que recebeu estimulação prolongada intermitente. Observa-se que os períodos de estimulação são capazes de promover quedas acentuadas na PA. Este traçado foi elaborado com registros obtidos após de 24 horas de estimulação.

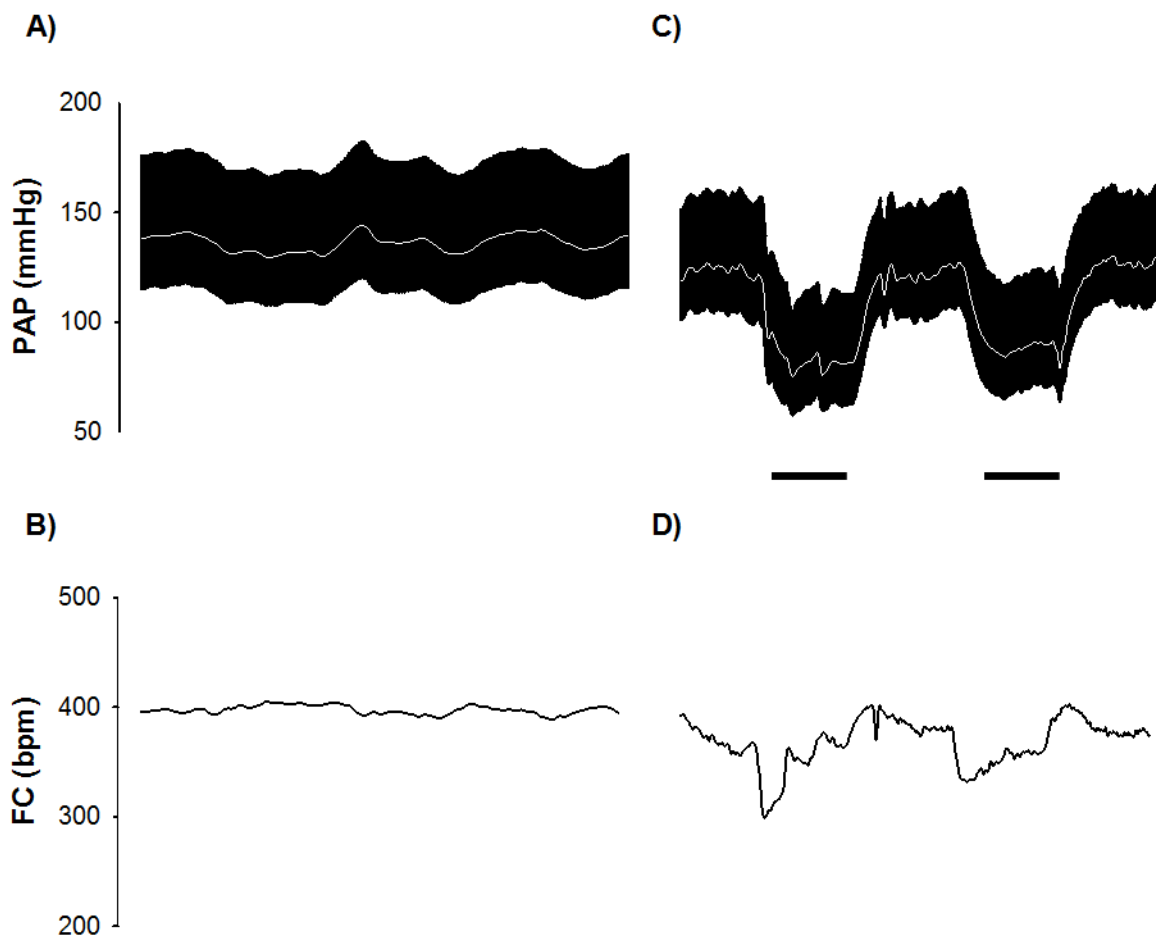


Figura 12 – Traçados típicos, representativos mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP) (A e C), pressão arterial média (linha branca) e frequência cardíaca (FC) (B e D) em resposta a estimulação elétrica (20 s) do SC (1 mA, 1 ms e 3V) de animais acordados hipertensos controle e estimulados. Este traçado representa um trecho do registro de pressão arterial. As barras pretas representam os 20 s de estimulação.

4.6 Reatividade vascular da artéria mesentérica isolada

4.6.1 Avaliação da resposta relaxante dependente de endotélio

Ao dados abaixo mostram os efeitos da estimulação elétrica crônica do SC sobre a potência da acetilcolina (ACh) em produzir relaxamento em anéis de artérias mesentéricas (Figura 13, Tabela 2). Podemos observar claramente que a estimulação promoveu aumento significativo nesta resposta.

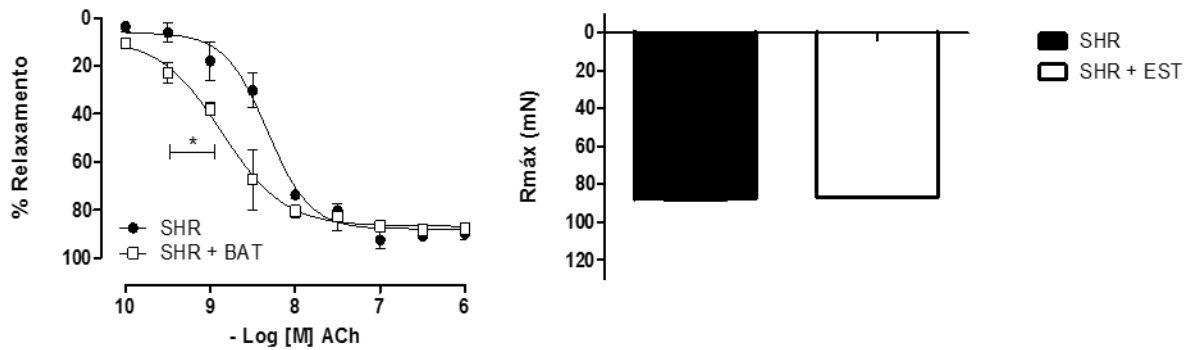


Figura 13 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para acetilcolina (ACh) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. $n = 5-7$, respectivamente. $*p < 0.05$ vs. SHR.

Tabela 2 - Resposta máxima e potência da acetilcolina (ACh) em produzir relaxamento em anéis de artérias mesentéricas isoladas de SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST).

	SHR		SHR + EST	
ACh	R_{máx} 87,9 ± 1,4	EC₅₀ -8,3 ± 0,10	R_{máx} 86,8 ± 0,1	EC₅₀ -8,8 ± 0,1
	(5)		(7)	

Os valores de R_{máx} (resposta máxima) representam a média ± EPM.

EC₅₀ – concentração que promove 50% da R_{máx}.

O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.

*p<0.05 vs. SHR.

4.6.2 Avaliação da resposta relaxante independente de endotélio

É possível observar que a estimulação elétrica crônica do SC não foi significativamente diferente entre os grupos quando avaliada a potência do nitroprussiato de sódio (NPS), doador de NO, em produzir relaxamento nos anéis de artérias mesentéricas (Figura 14, Tabela 3).

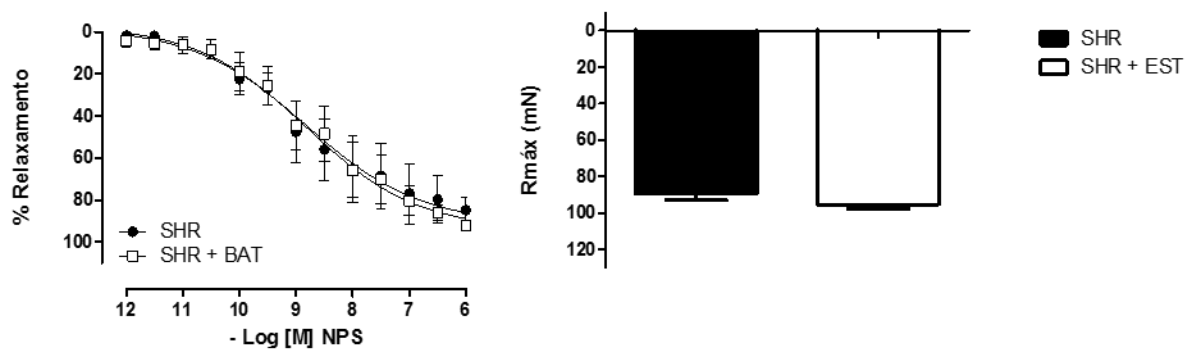


Figura 14 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) Resposta máxima para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente.

Tabela 3 - Resposta máxima e potência do nitroprussiato de sódio (NPS) em produzir relaxamento em anéis de artérias mesentéricas isoladas de SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST).

	SHR		SHR + EST	
NPS	R _{máx}	EC ₅₀	R _{máx}	EC ₅₀
	89,4 ± 7,6	-9,0 ± 0,35	95,3 ± 6,2	-8,6 ± 0,23
	(5)		(7)	

Os valores de R_{máx} (resposta máxima) representam a média ± EPM.

EC₅₀ – concentração que promove 50% da R_{máx}.

O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.

4.6.3 Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina

Na presença do endotélio vascular, a resposta máxima vasoconstritora bem como a potência da fenilefrina em produzir contração em anéis de artérias mesentéricas foi significativamente maior nos animais que receberam a estimulação crônica do SC (Figura 15, Tabela 4).

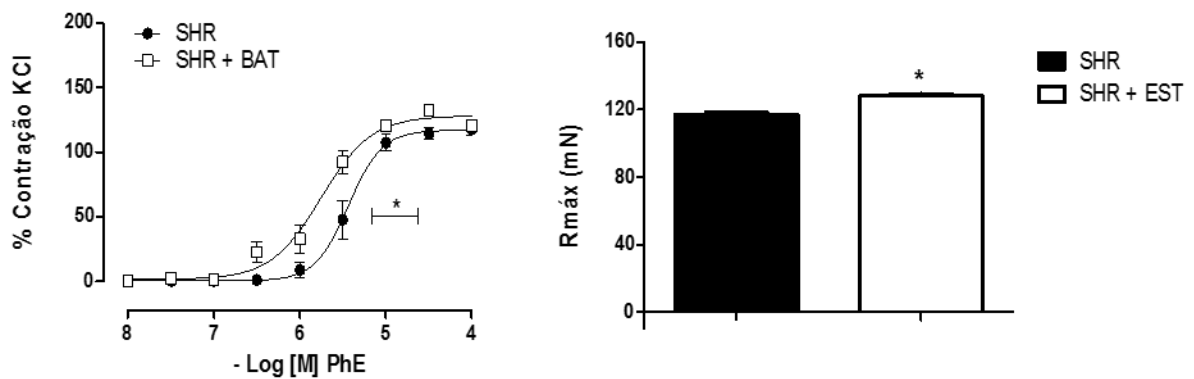


Figura 15 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para fenilefrina (PhE) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente. *p<0.05 vs. SHR.

Tabela 4 - Resposta Máxima e potência da Fenilefrina (Phe) em produzir contração em anéis de artérias mesentéricas isoladas de SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST).

	SHR		SHR + EST	
	R _{máx}	EC ₅₀	R _{máx}	EC ₅₀
Fe	117,0 ± 3,5 (5)	-5,4 ± 0,03	128,1 ± 3,6* (7)	-5,7 ± 0,04*

Os valores de R_{máx} (resposta máxima) representam a média ± EPM.

EC₅₀ – concentração que promove 50% da R_{máx}.

O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.

*p<0.05 vs. SHR.

4.6.4 Avaliação da resposta vasoconstritora a fenilefrina na ausência de endotélio

Na ausência do endotélio vascular, a resposta máxima vasoconstritora bem como a potência da fenilefrina em produzir contração em anéis de artérias mesentéricas na ausência de endotélio, também foram maiores no grupo de animais que tiveram o SC estimulado cronicamente (Figura 16, Tabela 5).

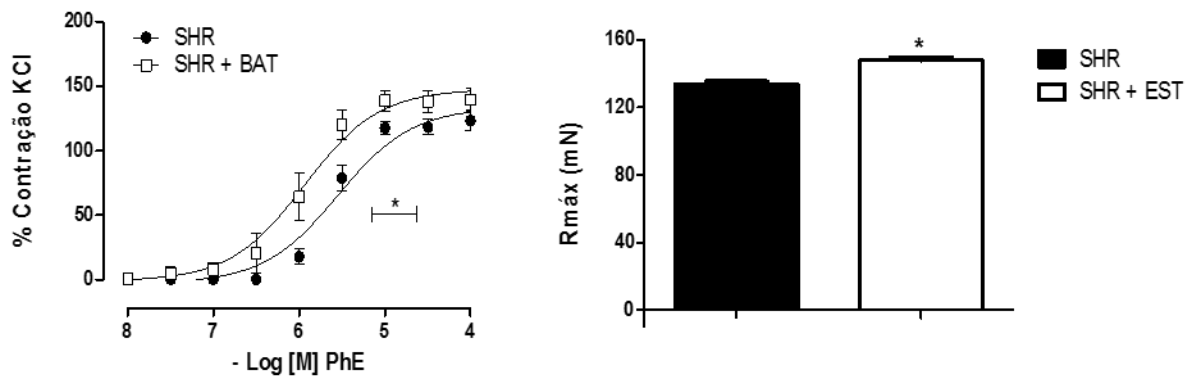


Figura 16 - (painel esquerdo) Curva concentração-resposta e (painel direito) resposta máxima para fenilefrina (PhE) em anéis de artérias mesentéricas isoladas de ratos SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST). Valores representados pela média \pm EPM. n = 5-7, respectivamente. *p<0.05 vs. SHR.

Tabela 5 - Resposta máxima e potência da Fenilefrina (Phe) em produzir contração em anéis de artérias mesentéricas isoladas sem endotélio isoladas de SHR controles (SHR) ou estimulados (SHR+EST).

	SHR		SHR + EST	
	R _{máx}	EC ₅₀	R _{máx}	EC ₅₀
Phe	133,7 ± 4,1 (5)	-5,5 ± 0,06	147,8 ± 5,5* (7)	-5,9 ± 0,08*

Os valores de R_{máx} (resposta máxima) representam a média ± EPM.

EC₅₀ – concentração que promove 50% da R_{máx}.

O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses.

*p<0.05 vs. SHR.

4.7 Efeito da estimulação crônica do seio carotídeo em SHR sobre a variabilidade da FC e PA

Os índices de variabilidade no domínio do tempo, da frequência e análise simbólica de SHR acordados antes e após a estimulação elétrica crônica (48 h) do SC, estão apresentados nas Tabelas abaixo.

Tabela 6 - Variabilidade de intervalo de pulso (IP), análise simbólica e da pressão arterial sistólica (PAS) antes (basal) e após a estimulação crônica do SC esquerdo de SHR.

Dados expressos pela média \pm EPM.

	Basal	Após Estímulo	Valor de P
Variabilidade do Intervalo de Pulso			
SDNN, ms	4.8 \pm 0.3	4.8 \pm 0.6	<i>ns</i>
RMSSD, ms	2.6 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	<i>ns</i>
LF, ms ²	1.1 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	<i>ns</i>
HF, ms ²	2.5 \pm 0.5	2.3 \pm 0.4	<i>ns</i>
LF, nu	30.8 \pm 2.5	26 \pm 3.0	<i>ns</i>
HF, nu	69.3 \pm 2.5	74 \pm 3.0	<i>ns</i>
LF/HF	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	<i>ns</i>
Análise simbólica			
0V %	25.0 \pm 3.8	23.0 \pm 2.6	<i>ns</i>
1V %	44.0 \pm 0.6	46.0 \pm 0.9	<i>ns</i>
2LV %	6.0 \pm 0.1	6.0 \pm 0.8	<i>ns</i>
2UV %	26.0 \pm 5.0	26.0 \pm 2.0	<i>ns</i>
Variabilidade da Pressão Sistólica			
SD, mmHg	7.5 \pm 0.5	7.3 \pm 0.4	<i>ns</i>
LF, mmHg ²	7.9 \pm 1.9	9.7 \pm 1.8	<i>ns</i>

Valores são representados pela média \pm EPM; SDNN: desvio padrão dos intervalos normais; RMSSD: raiz quadrada do quadrado das diferenças sucessivas dos IP; LF: potência da banda de baixa frequência (low frequency); HF: potência da banda de alta frequência (high frequency); 0V: zero variação, três símbolos iguais; 1V: uma variação, dois símbolos iguais e um diferente; 2LV: três símbolos diferentes que variam na mesma direção; 2UV: duas variações, três símbolos diferentes que variam em direções opostas.

ns = não significativo, n = 9.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A utilização de técnicas de estimulação elétrica de nervos periféricos vem sendo muito estudada, tanto em modelos experimentais quanto em ensaios clínicos para uma grande variedade de condições patológicas. A estimulação elétrica dos barorreceptores não é uma abordagem nova em modelos experimentais [Lohmeier e cols. 2005, Hildebrandt e cols. 2014, Zannad e cols. 2015] ou em humanos [Illig e cols. 2006, Filippone cols. 2007, Schmidli e cols. 2007, Tordoir e cols. 2007, Scheffers e cols. 2010, Gassler e cols. 2012, Alnima e cols. 2013], pois há relatos da utilização, tanto clínica como experimental, dessa abordagem desde o início da década de 60. Estas técnicas têm se aperfeiçoado e vêm se estabelecendo como procedimentos seguros e eficazes para as condições a que se destinam. No entanto, a adoção dessas metodologias muitas vezes é indicada em situações clínicas onde praticamente não há outra opção terapêutica [Griffith e Schwartz 1964, Neistadt e cols. 1967, Lohmeier e cols. 2005].

Os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, que a estimulação elétrica do SC, em ratos acordados, foi eficaz em produzir respostas hemodinâmicas como hipotensão e bradicardia em ratos normotensos e também em SHR. Este estudo, além de demonstrar os dados relativos à impedância elétrica do SC, traz informações importantes relacionados à caracterização dessas respostas através da aplicação de diferentes metodologias de estímulos (curtos e longos) utilizados de forma intermitente ou contínua. Além disso, mostrou-se também o impacto da estimulação elétrica crônica do SC sobre respostas em vasos de resistência e sobre a variabilidade da FC e da PA.

5.1 Caracterização das respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do seio carotídeo à aplicação de diferentes parâmetros de estimulação em ratos Wistar e SHR

A estimulação elétrica do SC permite avaliar o papel dos mecanismos neurais envolvidos na regulação cardiovascular barorreflexa além de ser considerada uma abordagem terapêutica em condições patológicas como hipertensão arterial ou insuficiência cardíaca [Fallick e cols. 2011, Georgakopoulos e cols. 2011, Hildebrandt e cols. 2014]. Levando em conta o papel translacional da estimulação barorreflexa, destaca-se a importância do conhecimento dessa abordagem em ratos, a qual possibilita testes de diferentes parâmetros de estimulação.

Inicialmente, os nossos resultados mostraram que a impedância elétrica do SC varia consideravelmente de um rato para o outro. Uma vez que a resistência elétrica (impedância) dos tecidos pode variar, a utilização de corrente fixa, ao em vez de voltagem constante, contribui para a uniformização da intensidade do estímulo elétrico aplicado. No entanto, para adequada utilização da estimulação através de uma corrente constante, é necessária uma tensão elétrica suficiente para manter a corrente desejada [Luan e Constandinou, 2014]. Assim, a seleção dos parâmetros deve levar em consideração o objetivo da terapia e o tempo desejado para sua utilização. Nossos resultados permitem compreender melhor os mecanismos que influenciam na aplicação deste estímulo em ratos acordados, seja ele curto ou de longo prazo.

Os dados mostram que a hipotensão induzida pela estimulação do SC foi mais acentuada em SHR, independente da duração dos estímulos (20 s ou 60 minutos). Este resultado está de acordo com uma observação anterior do nosso laboratório, onde a estimulação elétrica do nervo depressor aórtico provocou maiores respostas na PA e FC

de SHR em comparação com ratos Wistar normotensos [[Salgado e cols. 2007](#)].

A magnitude da resposta hipotensora seguiu um padrão dependente da frequência de estimulação, quando aplicada nos SHR, porém tal fato não ocorreu nos ratos Wistar. A resposta bradicárdica não seguiu um padrão dependente da frequência em nenhuma das linhagens de ratos. Esse achado diferiu de estudos prévios realizados em nosso laboratório [[De Paula e cols. 1999](#), [Salgado e cols. 2007](#)], os quais mostraram que a estimulação do nervo depressor aórtico em ratos acordados induziu uma hipotensão e bradicardia dependente da frequência de estimulação utilizada.

Nossos resultados mostraram ainda que não há diferenças na estimulação do SC, quando o estímulo é aplicado de forma contínua ou intermitente (ciclos alternados de 20 s). Estudos clínicos ou experimentais são realizados aplicando-se em sua quase totalidade, estímulos contínuos. Alguns estudos mostraram que a estimulação elétrica contínua pode perturbar a função de componentes periféricos ou centrais do barorreflexo, causando assim uma falha neste mecanismo reflexo [[Robertson e cols. 1993](#), [Heusser e cols. 2005](#)]. Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado que a estimulação contínua do SC não prejudica a função barorreflexa [[Heusser e cols. 2010](#)]. Além disso, num estudo realizado em pacientes com hipertensão resistente foi observado que a redução da PA foi mantida mesmo após um ano de estimulação elétrica contínua do SC [[Alnima e cols. 2012](#)]. Além de alterações hemodinâmicas, a estimulação elétrica dos barorreceptores carotídeos evoca uma redução coordenada do fluxo simpático para o coração, vasos e os rins [[Esler e cols. 1985](#), [Lohmeier e cols. 2015](#)], bem como promove o aumento da atividade parassimpática cardíaca [[Heusser e cols. 2010](#), [Madershahian e cols. 2014](#)].

5.2 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial antes e após a estimulação elétrica contínua (60 min) do seio carotídeo em ratos Wistar e SHR

Avaliou-se a variabilidade do IP e PA sistólica no domínio do tempo e da frequência, além de métodos não lineares, antes e durante a estimulação contínua prolongada (60 min) do SC. Nos ratos normotensos, apenas a porcentagem de padrões 2UV e a potência do espectro da PA na banda de LF foram afetados pela estimulação do SC, de modo a sugerir uma diminuição da atividade simpática nesses animais. Nesse sentido, alguns estudos realizados em humanos com hipertensão resistente, que tiveram a estimulação do SC, mostraram alteração da variabilidade da FC no domínio da frequência, indicando alterações cardiovasculares consistentes com a redução da modulação simpática e aumento da modulação parassimpática cardíaca [Wustmann e cols. 2009, Heusser e cols. 2010].

A ausência de diferenças significativas marcantes sobre a variabilidade da FC e PA nos SHR pode ser explicada pelo fato de estar ocorrendo uma estimulação concomitante do quimiorreceptores carotídeos durante a estimulação do SC. Tal fato pode ter causado um efeito oposto ao dos barorreceptores, resultando no aumento da atividade simpática, visto que a atividade quimiorreflexa é diretamente proporcional a esta ação [Heusser e cols. 2010]. Além disso, durante a queda acentuada da PA, a desativação abrupta dos barorreceptores aórticos e também do SC contralateral ao implante dos estimuladores, pode atenuar a mudança no balanço simpato-vagal durante a estimulação.

5.3 Respostas hemodinâmicas e vasculares à estimulação prolongada do seio carotídeo de animais SHR

Os nossos resultados demonstram, pela primeira vez, os efeitos da estimulação elétrica prolongada (48 h) do SC em SHR. Podemos observar que a estimulação do SC foi efetiva em promover uma resposta hipotensora nos SHR durante as 48 de aplicação do estímulo. Esta hipotensão perdura durante todo o período de estimulação e se mantém até 60 min após o desligamento do dispositivo. No estudo realizado com cães hipertensos [Lohmeier e cols., 2007] que tiveram o SC estimulado por sete dias, foram observados resultados semelhantes aos nossos, visto que quando os estimuladores destes animais foram desligados, os efeitos perduraram sobre a PA e FC [Lohmeier e cols., 2007]. Nossos resultados também mostraram uma resposta bradicárdica após 24 horas de estimulação, no entanto esta diferença é abolida após 48 horas.

A resposta hipotensora manteve-se durante as 48 h de estimulação e perdurou após uma hora do desligamento do dispositivo de estimulação. Este dado é relevante, tanto em seu aspecto experimental como translacional, uma vez que a terapia de ativação do barorreflexo tem sido amplamente utilizada em ensaios clínicos, como terapia complementar à ação farmacológica anti-hipertensiva. Estes achados podem contribuir para uma melhor elucidação de mecanismos envolvidos na resposta hipotensora da estimulação elétrica dos barorreceptores. Neste contexto, vale a pena ressaltar o estudo *Rheos Pivotal Trial*, primeiro grande ensaio clínico realizado nos Estados Unidos [Scheffers e cols. 2010]. Este estudo foi realizado através de um dispositivo implantado cirurgicamente em pacientes com hipertensão refratária e observou diminuição significativa da PA nesses pacientes.

No presente estudo, foi utilizada a estimulação elétrica intermitente através de um dispositivo implantável adaptado para ratos, desenvolvido e fabricado em nosso laboratório, semelhante ao utilizado nos ensaios clínicos [Scheffers e cols. 2010]. Este

dispositivo foi programado para permitir estímulos cíclicos intermitentes (20 s ligado e 20 s desligado). Optamos por estímulos intermitentes, uma vez que nossos estudos prévios mostraram que estímulos contínuos ou intermitentes produzem respostas hemodinâmicas de mesma magnitude [[Domingos-Souza e cols. 2015](#)]. Assim, além de evitar uso desnecessário da bateria do dispositivo, evitamos uma estimulação excessiva dos barorreceptores, impedindo assim uma possível adaptação das terminações nervosas barorreceptoras à terapia.

Dentre os resultados mais importantes encontrados na estimulação do SC de SHR, além da diminuição da PA, podemos destacar os seus efeitos na reatividade vascular de vasos de resistência (artéria mesentérica). Constatamos um aumento expressivo da sensibilidade das artérias mesentéricas à acetilcolina, além da sensibilidade aumentada à fenilefrina na presença e ausência do endotélio vascular. A compreensão de mecanismos envolvidos na regulação da PA, FC e tônus vascular promovida pela estimulação dos barorreceptores em SHR tem sua importância creditada à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão primária do homem. Este modelo tem se revelado bastante útil para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos, quer do próprio modelo em si, quer da hipertensão primária em seres humanos. Este é um estudo pioneiro a mostrar respostas vasculares da estimulação do SC em SHR.

O leito mesentérico é responsável pela circulação de aproximadamente 20 a 40% do volume sanguíneo total, representando um importante leito vascular de resistência. Sendo assim, são as artérias de pequeno calibre que apresentam maior resistência e que estão mais envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo e da PA [[Furness e Marshall, 1974](#)]. Nossos dados indicam uma menor atividade simpática e aumento da atividade vagal, baseados nas alterações observadas sobre a PA e FC, frente à estimulação

crônica dos barorreceptores do SC. No entanto, foi constatado um aumento da contratilidade das artérias mesentéricas à Phe (agonista alfa-1 adrenérgico), na presença ou não do endotélio vascular, uma vez que a remoção do endotélio manteve as mesmas diferenças observadas entre os grupos. Ou seja, a redução da PA e FC em animais hipertensos está ocorrendo independente de maior responsividade do vaso à Phe. Sendo assim, a redução da PA pode estar relacionada diretamente com o débito cardíaco (volume de sangue bombeado para a aorta a cada minuto) já que este é o produto da FC pelo volume sistólico, o qual possivelmente está diminuído [Guyton e Hall 2006].

Adicionalmente, o relaxamento para Ach está aumentado nas artérias mesentéricas dos animais estimulados, sugerindo melhora na função endotelial após a estimulação crônica do SC. Talvez o endotélio possa exercer importante função na redução da PA, mas não o suficiente para tamponar a maior contração dos anéis à Phe. A Phe é um agonista α 1-adrenérgico e seus receptores α 1-adrenérgicos subdividem-se em três subtipos: α 1A, α 1B, e α 1D que são expressos simultaneamente no músculo liso vascular e todos acoplados à proteína $G_{q/11}$ [Zhong e Minneman 1999]. Foi observado que durante o amadurecimento e envelhecimento de ratos, a responsividade vascular bem como a expressão dos subtipos de α 1-adrenoceptores podem sofrer variações [de Oliveira e cols. 1998]. Baseado em tais constatações, hipoteticamente podemos dizer que embora a diminuição da PA seja evidente, a diminuição da atividade simpática devido à estimulação crônica dos barorreceptores do SC estaria provocando alterações estruturais como por exemplo, o aumento da expressão de receptores alfa-1 adrenérgicos ou até mesmo exacerbando ou diminuindo alguns elementos da via de sinalização para Phe (PKC, ERK1/2, Rho-kinase), o que estaria diretamente resultando no aumento de contração e tamponando as alterações que talvez seriam vistas sobre a

função endotelial. Para confirmar tais hipóteses, seria necessário realizar experimentos de curvas para fenilefrina na presença de inibidores de fatores endoteliais como por exemplo a indometacina ou L-NAME e até mesmo experimentos que avaliassem a expressão e quantificação desses receptores.

Na hipertensão do SHR observa-se aumento da resistência periférica total [Judy e cols. 1976, Lundin e cols. 1984] e uma acentuada hiperatividade simpática [Pfeffer and Frohlich 1973], alterações que prejudicam as funções vasculares. O tônus vasomotor exerce um papel importante na homeostasia do sistema cardiovascular, sofrendo grande influência de neurotransmissores [Furchgott e Vanhoutte, 1989], de hormônios circulantes [Nasjletti e Malik, 1982], de metabólitos gerados localmente [Mcintyre, Bohr e Dominiczak, 1999], bem como de fatores liberados por células sanguíneas e células do sistema imune.

Tais achados nos fazem crer que a ativação do barorreflexo poderia estar promovendo alterações moleculares relacionadas a estes fatores, inclusive com a produção de óxido nítrico (NO). No entanto, experimentos futuros deverão ser realizados para elucidar tais vias e mecanismos. Sabe-se que o NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. A sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) [Morris e cols.,1994]. Além do NO, outro fator importante para o relaxamento da musculatura lisa principalmente em vasos de resistência é o EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor ou Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio) [Cohen e Vanhoutte, 1995]. Sabendo que a influência de EDHF em artérias

mesentéricas é muito grande e considerando que os vasos responderam de maneira semelhante ao NPS (relaxamento independente do endotélio vascular), podemos incluí-lo como um forte contribuinte desse maior relaxamento, observado nos animais que receberam estimulação crônica do SC.

Dentre os principais fatores relaxantes que são liberados pelo endotélio ou EDRF do inglês, Endothelial-Derived Relaxing Factor, estão o NO, a prostaciclina e o EDHF. Dentre os principais fatores contráteis estão a prostaglandina H2 (PGH2), tromboxana A2, angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1) e ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) [Feletou e Vanhoutte 1999]. Todavia podem estar ocorrendo alterações vasculares tanto resultantes na diminuição dos fatores contráteis endoteliais, quanto no aumento da produção dos fatores relaxantes. Tais evidências tornam-se mais relevantes visto que não foram observadas alterações nas respostas vasculares relacionadas ao NPS, já que suas respostas estão diretamente ligadas à atividade da musculatura lisa vascular.

Recentemente, foi demonstrado que o fator de crescimento endotelial vascular produz uma facilitação tônica na atividade barorreflexa do ramo vagal cardíaco [Tsai e cols. 2015], evidenciando uma possível interação não só através do barorreflexo facilitando o relaxamento vascular, mas da vasculatura influenciando o aumento na sensibilidade vagal barorreflexa. As reduções efetivas mediadas pelo barorreflexo na resistência vascular e PA incentivam cada vez mais a investigação do uso desta terapia no tratamento de hipertensão arterial crônica. No entanto, muitos dos fatores centrais ou periféricos envolvidos nas respostas da estimulação elétrica do SC ainda permanecem obscuros e exigem investigações mais minuciosas.

Podemos constatar claramente que a estimulação elétrica do SC promove alterações vasculares importantes nos SHR, e que essas alterações estão diretamente relacionadas a diminuição da PA. No entanto, estudos futuros de biologia molecular e vias de sinalização tanto do NO, quanto dos demais neurotransmissores, hormônios, metabólitos locais ou fatores endoteliais diretamente relacionados ao tônus vascular devem ser investigados, afim de descreverem a fundo tais observações.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A estimulação elétrica do SC em ratos acordados normotensos ou SHR foi eficaz em promover alterações hemodinâmicas (PA e FC) e vasculares, bem como na modulação autonômica cardíaca. Em animais hipertensos, a resposta hipotensora foi dependente da frequência de estimulação utilizada. Já a resposta bradicárdica independe da frequência de estimulação em ambas as linhagens. Quando comparados os estímulos intermitente ou contínuo, não observamos diferenças significativas, mostrando a efetividade semelhante de ambas as abordagens. As alterações sobre a variabilidade cardiovascular foram observadas apenas nos animais normotensos. Quando aplicado o estímulo longo contínuo (60 min) observa-se uma diminuição na potência da banda de LF da PA, sugerindo uma inibição da atividade simpática nesses animais.

Adicionalmente, quando aplicada a estimulação crônica do SC de animais SHR, constatamos um aumento expressivo da sensibilidade das artérias mesentéricas à Ach e aumento da sensibilidade à fenilefrina na presença e ausência do endotélio vascular. No entanto, não observamos alterações sobre os parâmetros da variabilidade cardiovascular.

**ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PROLONGADA DO SEIO CAROTÍDEO DE RATOS
HIPERTENSOS L-LAME**

A disponibilidade dos SHR, no peso e idade utilizados nos diversos protocolos desta tese, determinou períodos onde não tínhamos animais para realização dos experimentos. Então, paralelamente aos experimentos com SHR, aplicamos a estimulação elétrica do SC em um outro modelo de hipertensão arterial em ratos, a hipertensão induzida pelo tratamento com L-Nitro Arginina Metil Éster (L-NAME). Este período de experimentos foi muito produtivo e possibilitou a geração de resultados que permitirão a redação de um manuscrito mostrando os efeitos da estimulação elétrica do SC neste modelo de hipertensão.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que o óxido nítrico (NO) participa continuamente da regulação do tônus vascular e da manutenção do fluxo sanguíneo [Umans and Levi 1995]. Este gás constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) [Morris e cols.1994].

O modelo de hipertensão arterial induzida pela administração prolongada de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), foi originalmente descrito por Ribeiro e cols. [1992], os quais observaram que a administração de L-NAME junto à água de beber de ratos, durante 4 a 6 semanas, provocou elevação da PA. Esta hipertensão é caracterizada como tempo e dose dependente [Arnal e cols. 1992]. Está associada, também, à vasoconstrição predominantemente arteriolar, e ao aumento da resistência vascular periférica

[Vasquez e cols. 1994; Yamada e cols. 1996; Qui e cols. 1998; Souza e cols. 2001 Biancardi e cols. 2007]. Este é o primeiro estudo realizado afim de avaliar o impacto da ativação prolongada do barorreflexo de ratos sobre os parâmetros hemodinâmicos neste modelo de hipertensão experimental. Então, o objetivo da realização destes experimentos adicionais foi avaliar as respostas hemodinâmicas (PAM e FC), variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial à estimulação elétrica dos barorreceptores do SC em animais acordados hipertensos L-NAME.

MÉTODOS

Animais:

Para o desenvolvimento do presente projeto todos os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (CETEA, protocolo 023/2013-1). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com aproximadamente 300g de peso corporal (15 a 18 semanas de idade). Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas e todo o material implantado nos ratos foi devidamente esterilizado.

Implantação dos eletrodos no seio carotídeo e canulação vascular:

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg, ip União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) and xilazina (10 mg/kg, ip Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba, MG, Brasil) e, com a utilização de um microscópio

cirúrgico (M902MFZ, DFV Com. Ind. Ltda, São Paulo, SP), o SC do lado esquerdo, foi identificado, cuidadosamente isolado, envolvido por um par de eletrodos e isolado das estruturas vizinhas por resina que polimeriza a frio (Kwik-Sil, World Precision Instruments Inc., Sarasota, Flórida, USA). Então, os eletrodos ao redor do SC foram conectados a geradores miniaturizados, alimentados por bateria e operados remotamente, que foram implantados no tecido subcutâneo do dorso dos ratos. Esses geradores implantáveis foram projetados e construídos no nosso laboratório.

Após o implante dos eletrodos ao redor do SC, os ratos receberam um catéter de polietileno (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) na artéria femoral esquerda para registro direto da PA. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam (0,7 mg/kg im) veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, SP, Brasil).

Um grupo de ratos foi submetido apenas à cateterização da artéria femoral, ou seja, não recebeu os eletrodos ao redor do SC.

Protocolo experimental:

A hipertensão arterial foi induzida nos ratos pela administração diária de NG-nitro-Larginina-metil-éster (L-NAME, 70 mg/kg) por gavagem durante 10 dias. No sétimo dia de tratamento os animais foram anestesiados e receberam o implante do estimulador portátil no SC e canulação da artéria femoral, como descrito anteriormente. No dia seguinte aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos a um registro basal de PA e FC por uma hora. Em seguida, um grupo de animais tiveram os estimuladores ligados (estimulado) e outro grupo não (controle). O grupo onde os ratos não foram implantados com eletrodos ao redor do SC foi chamado de sham, porque foram

submetidos apenas ao procedimento cirúrgico. Os geradores implantados foram programados para aplicar pulsos de onda quadrada com 3 Volts de intensidade, 1 ms de duração, com uma frequência de 30 Hz, de modo intermitente, com ciclos de duração de 20 segundos ON e 20 segundos OFF, por 48 horas. Após o desligamento dos estimuladores foi feito um novo registro de PA e FC por um período de uma hora.

Análise espectral da pressão arterial e da frequência cardíaca

Estas análises foram feitas assim como descrito no corpo da tese por meio de um programa computacional de uso livre (CardioSeries: disponível em <http://sites.google.com/site/cardioseries>) desenvolvido no Departamento de Fisiologia da FMRP. Foram selecionados períodos de 60 minutos de registros basais e após o período de estimulação. Cada trecho teve os valores de intervalo de pulso (IP) e PA sistólica foram reamostrados em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PA foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch).

A estacionariedade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e aqueles com artefatos ou transientes, foram excluídos. Cada segmento de IP e PA foi submetido à análise espectral pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento do tipo Hanning. Os espectros de IP foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,2 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 - 3,0 Hz), com os resultados expressos em valores absolutos (ms^2) e unidades normalizadas (un), enquanto que os espectros de PAS foram integrados somente na banda de baixa frequência (LF: 0,2 - 0,75 Hz), com os resultados expressos em valores absolutos (mmHg^2). Os valores

normalizados foram obtidos através do cálculo da porcentagem da potência de LF e HF com relação à potência espectral total, menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF: $< 0,2$ Hz). O procedimento de normalização foi realizado para minimizar as variações da potência total nos valores absolutos dos componentes de LF e HF. Adicionalmente, a razão LF/HF também foi calculada para avaliação do balanço simpato-vagal sobre o coração.

Análise simbólica da variabilidade do intervalo de pulso

A variabilidade do IP também foi analisada por meio do método não linear denominado Análise Simbólica. Este método busca por padrões de alteração entre sucessivos valores de IP, classifica estas alterações em classes, e quantifica a ocorrência das mesmas [Guzzetti e cols. 2005; Porta e cols. 2001, 2007]. Para isso, foi utilizado outro programa computacional de uso livre (JBios). Séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP tiveram os valores máximos e mínimos determinados. Em seguida, utilizando-se estes valores previamente detectados (máximo e mínimo), os valores de IP foram distribuídos em 6 faixas de igual tamanho, às quais contemplam toda a faixa de variação dos valores da série temporal. Mantendo a distribuição cronológica original dos valores na série temporal, o programa computacional inspecionou sequências de 3 batimentos (com sobreposição dos últimos 2 batimentos da sequência anterior) em busca de alterações entre os valores, evidenciadas por mudanças nas faixas em que se encontravam os pontos. Este método permite a identificação de três tipos de variação, entre os valores, nas sequências de 3 batimentos: nenhuma variação (0V), uma variação (1V) ou duas variações (2V).

Análise estatística

Os valores de estimulação do SC ao longo do tempo foram comparados entre grupos usando análise de variância de duas vias (“two way” ANOVA). Quando diferenças foram encontradas, os dados foram comparados aos pares pelo teste de Newman-Kews. As mesmas variáveis foram comparadas antes e após a estimulação.

Os índices de variabilidade (domínio do tempo, domínio da frequência e análise simbólica) da pressão arterial sistólica e também do intervalo de pulso foram comparados antes e após o período de estimulação pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Alterações hemodinâmicas observadas na Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) à estimulação elétrica do seio carotídeo em ratos hipertensos L-NAME

A Figura 1 mostra os valores da PA e FC observadas antes e após 48 h de estimulação elétrica do SC em ratos hipertensos (L-NAME) acordados. A PA média basal dos ratos hipertensos foi de 176 ± 3 mmHg. Logo que o dispositivo de estimulação foi ligado, houve uma queda acentuada da PA ($\Delta = -51 \pm 5$ mmHg), que se recuperou, parcialmente, com o passar do tempo. Como esperado, nenhuma alteração foi observada na hemodinâmica (PAM e FC) do grupo controle (grupo OFF). O registro da PA realizado durante uma hora após o final da estimulação elétrica do SC mostrou que

os ratos estimulados apresentavam PA significativamente menor que àquela medida antes da estimulação (159 ± 3 mmHg). Não foram observadas diferenças significativa na FC de nenhum grupo após a estimulação do SC.

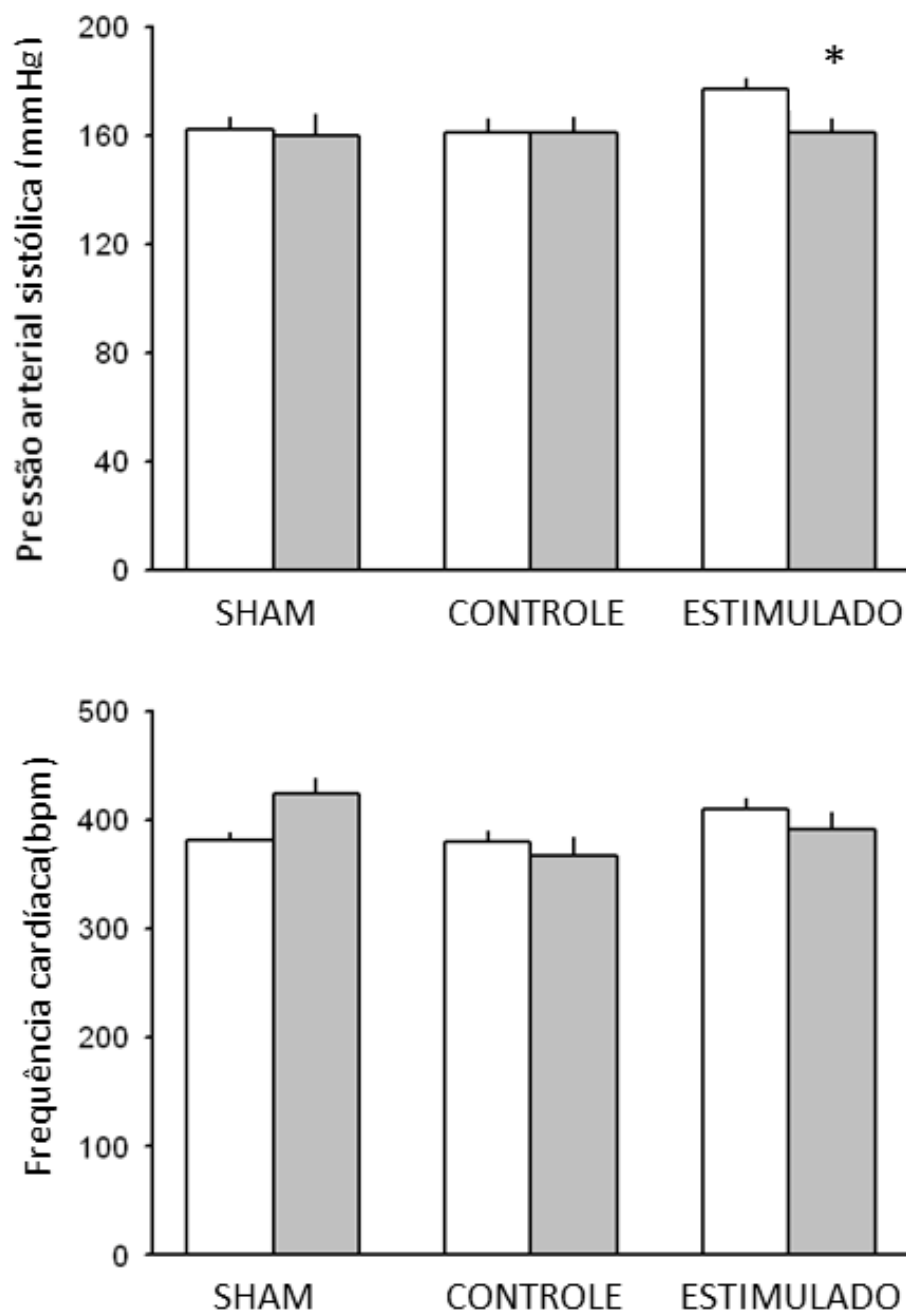


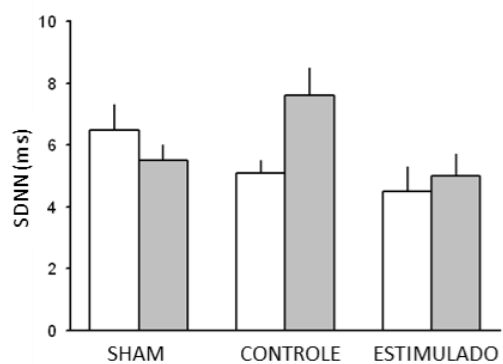
Figura 1 - Alterações hemodinâmicas da pressão arterial média (PAM) (painel superior) e Frequência Cardíaca (FC) (painel inferior) antes (barras brancas) após (barras cinzas) a estimulação crônica do SC (48h) em animais hipertensos L-NAME. Grupos: Sham – cirurgia fictícia; controle – dispositivo de estimulação desligado; estimulado – dispositivo de estimulação ligado (n = 6, 7 e 9, respectivamente) *P<0,05.

Efeito da estimulação prolongada do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME sobre a variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial

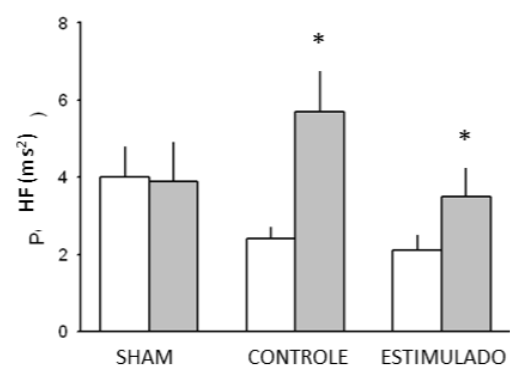
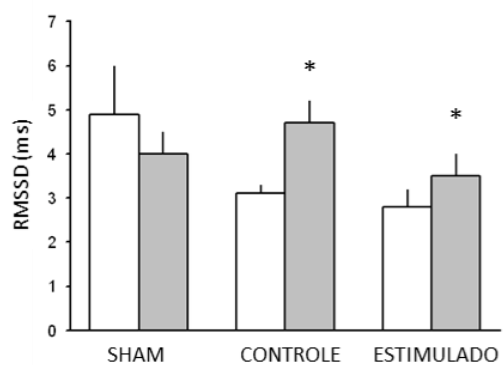
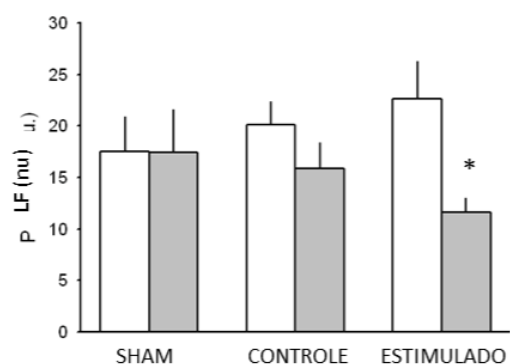
Os índices de variabilidade da PA e do IP de ratos acordados hipertensos (L-NAME) antes e após a estimulação elétrica do SC (48 h) estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

A estimulação crônica do SC não promoveu alteração na variabilidade total do IP (medida pelo SDNN), mas aumentou o RMSSD do IP. Curiosamente, também foi observado um aumento do RMSSD do IP nos ratos controles, onde o estimulador não foi ligado (grupo OFF). Após o período de estimulação também foi observada uma diminuição acentuada da potência da banda de LF e aumento na potência da banda de HF no espectro de IP. Curiosamente, o grupo OFF também apresentou aumento na potência do espectro de IP na banda de HF. A análise simbólica do IP revelou uma redução na ocorrência de sequências 0V e aumento na ocorrência de sequências 2UV nos grupos estimulado e OFF. O grupo controle não sofreu qualquer alteração na variabilidade do IP (domínio do tempo, análise espectral ou simbólica). Na variabilidade da PAS foram encontradas alterações apenas no grupo estimulado, onde foi observado diminuição de SD (6.3 ± 5 mmHg) e diminuição da potência de LF (3.8 ± 0.4 mmHg²).

Domínio do tempo



Análise espectral



Análise simbólica

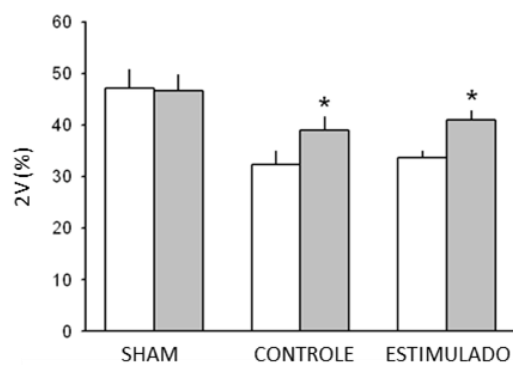
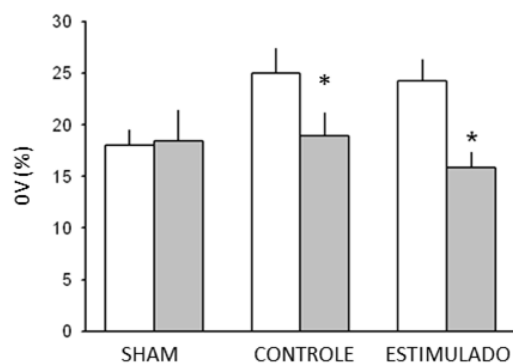


Figura 2 - Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo, análise espectral e análise simbólica, antes (barras brancas) e após (barras cinzas) a estimulação crônica do SC esquerdo de ratos acordados hipertensos L-NAME. Valores são representados pela média \pm EPM. SDNN: desvio padrão dos intervalos normais; RMSSD: raiz quadrada do quadrado das diferenças sucessivas dos IP; LF: potência da banda de baixa frequência (low frequency); HF: potência da banda de alta frequência (high frequency); 0V: zero variação, três símbolos iguais; 2V: duas variações. Sham – cirurgia fictícia; controle – dispositivo de estimulação desligado; estimulado – dispositivo de estimulação ligado. *P<0,05. (n = 6, 7 e 9, respectivamente). *P<0,05.

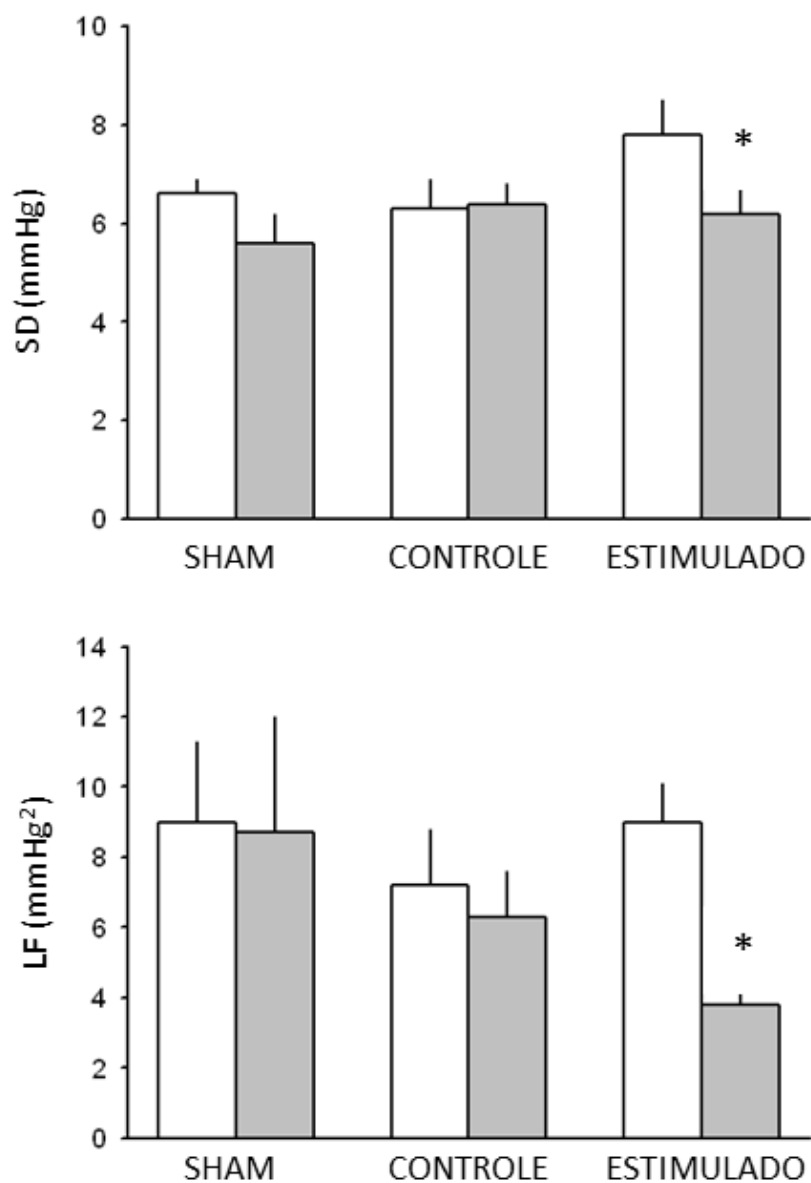


Figura 3 - Variabilidade da pressão arterial sistólica antes (barras brancas) e após (barras cinzas) a estimulação crônica do SC esquerdo de ratos acordados hipertensos L-NAME. Valores são representados pela média \pm EPM. * $P < 0,05$. (n = 6, 7 e 9, respectivamente). * $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os nossos resultados demonstram, pela primeira vez, os efeitos da estimulação elétrica prolongada do SC (48 h) em ratos com hipertensão induzida pelo tratamento com L-NAME. Assim como nos SHR, a estimulação do SC levou a uma redução da PA que perdurou, pelo menos, 60 min após o término da estimulação. No entanto, curiosamente, a estimulação elétrica do SC não alterou a FC dos ratos com hipertensão L-NAME, contrariando observações em outros modelos experimentais [Lohmeier e cols. 2004, Illig e cols. 2006, Lohmeier e cols. 2010, Bisognano e cols. 2011, Scheffers e cols. 2010]. Tal fato pode ser justificado visto que estudos prévios de nosso laboratório mostraram ausência de taquicardia neste modelo de hipertensão [Santos e cols. 2009, Sabino e cols. 2011].

Nós utilizamos a estimulação elétrica intermitente, da mesma forma utilizada nos SHR (dados mostrados na seção anterior desta tese) através de um dispositivo implantável adaptado para ratos semelhante ao utilizado em ensaios clínicos [Scheffers e cols. 2010, Bloch e cols. 2012]. O dispositivo foi programado para liberar estímulos cíclicos intermitentes (20s ligado - 20s desligado) com parâmetros fixos programados em 3 Volts, 1 ms e 30 Hz.

A aplicação da estimulação do SC foi efetiva em promover uma redução acentuada na potência dos espectros do IP e da PA na banda de LF. Além disso, houve um aumento na potência do espectro do IP na banda de HF, tanto nos animais estimulados quanto no grupo OFF. No domínio do tempo, observamos um aumento do RMSSD do IP tanto no grupo estimulado como naquele em que o estimulador foi mantido desligado (OFF). Esses dados sugerem que além da estimulação do SC, o simples

posicionamento dos eletrodos no SC é capaz de alterar os índices de variabilidade cardiovascular. Além destes achados, apenas o grupo estimulado mostrou alterações no desvio padrão da PA, que se encontrou diminuído após a estimulação. Tais achados, sugerem uma melhora da função barorreflexa, que geralmente está prejudicada na hipertensão arterial [Parati e Esler 2012].

Tais alterações observadas sobre a variabilidade cardiovascular sugerem uma diminuição da atividade simpática e aumento da modulação vagal. Alguns estudos com humanos hipertensos mostraram alteração da VFC no domínio da frequência, indicando alterações cardiovasculares consistentes com a redução da modulação simpática e aumento da modulação parassimpática cardíaca [Wustmann e cols. 2009, Helsser e cols. 2010].

A fim de mostrar que apenas o contato dos eletrodos com as terminações do SC é capaz de promover alterações dos índices de variabilidade cardiovascular, fomos impulsionados a realizar estas análises em um grupo de animais que passaram apenas pelo isolamento cirúrgico do SC (sham), sem posicionar os eletrodos na bifurcação carotídea, que poderiam produzir uma estimulação mecânica, e obviamente, sem estimulação elétrica do SC. Os resultados destes experimentos confirmaram a hipótese de que apenas o contato mecânico dos eletrodos com as terminações barorreceptoras do SC pode provocar as alterações observadas, ratificando que os efeitos sobre a variabilidade cardiovascular se devem à estimulação não só elétrica como mecânica dos barorreceptores carotídeos.

CONCLUSÕES

Concluimos que a estimulação elétrica do SC (48 h) produz uma resposta hipotensora, mas não bradicardia, em ratos com hipertensão induzida pelo L-NAME. Esta hipotensão se mantém por uma hora após o dispositivo de estimulação ser desligado. Além disso, a estimulação promoveu uma redução acentuada na potência do espectro da PA e do IP na banda de LF, sugerindo uma redução na modulação simpática e um aumento da modulação vagal cardíaca. Adicionalmente, concluimos que os efeitos sobre a variabilidade cardiovascular se devem à estimulação não só elétrica como mecânica dos barorreceptores carotídeos.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Akselrod, S., Gordon, D., Madwed, J., Snidman, N., Shannon, D., and Cohen, R. (1985). Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am J Physiol*, 249:H867–875.

Aldhahi, W.; Hamdy, O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep*, v. 3, n. 4, p. 293-8, Aug 2003. ISSN 1534-4827 (Print).

Alnima T, de Leeuw PW, Kroon AA. Baroreflex activation therapy for the treatment of drug-resistant hypertension: new developments. *Cardiol Res Pract* 2012.

Alnima T, de Leeuw PW, Tan FES, Kroon AA, Rheos Pivotal Trial Investigators. Renal responses to long-term carotid baroreflex activation therapy in patients with drug-resistant hypertension. *Hypertension* 2013.

A Randomized Controlled Trial of Chronic Vagus Nerve Stimulation for Treatment of Medically Intractable Seizures. The Vagus Nerve Stimulation Study Group.” 1995. *Neurology* 45 (2): 224–30.

Bertinieri G, Di Rienzo M, Cavallazzi A, Ferrari AU, Pedotti A, Mancia G. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. *J Hypertens Suppl* 1985; Dec 3:S79-81.

Billman GE. Heart rate variability - a historical perspective. *Front Physiol* 2011; 2:86.

Binkley PF, Nunziata E, Haas GJ, Nelson SD, Cody RJ. Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: demonstration

in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *J Am Coll Cardiol* 18 (2): 464-472, 1991.

Bisognano JD, Bakris G, Nadim MK, Sanchez L, Kroon AA, Schafer J, de Leeuw PW, Sica DA. Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled reos pivotal trial. *J Am Coll Cardiol*. 2011, 9; 58(7): 765-73.

Brasil. Ministério da Saúde. Hipertensão Arterial Sistêmica para o Sistema Único de Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica: Brasília 2006.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289:2560-72.

De Oliveria, A.M.; Campos-Mello, C.; Leitão, M.C.; Correa, F.M.A. Maturation and aging-related differences in responsiveness of rat aorta and carotid arteries to alfa1-adrenoceptor stimulation. *Pharmacology*, v.57, p.305-313, 1998.

De Paula PM, Castania JA, Bonagamba LG, Salgado HC, Machado BH. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *Am J Physiol* 1999; 277: R31-38.

Domingos-Souza G, Meschiari CA, Buzelle SL, Callera JC, Antunes-Rodrigues J. Sodium and water intake are not affected by GABAC receptor activation in the lateral parabrachial nucleus of sodium-depleted rats. *J Chem Neuroanat*. 2016, 9;74:47-54

Domingos-Souza, Fernanda Santos-Almeida, Luiz Eduardo Silva, Daniel Dias, Carlos Alberto da Silva, Jaci Castania, Helio Salgado, and Rubens Fazan, Jr. Electrical Stimulation of Carotid Sinus in Conscious Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *FASEB J* April 2015 29:648.10.

Esler M, Lambert E, Schlaich M. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985.

Fallick C, Sobotka PA, Dunlap ME. Sympathetically mediated changes in capacitance: redistribution of the venous reservoir as a cause of decompensation. *Circ Heart Fail* 2011; 4: 669-675.

Feletou, M.; Vanhoutte, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol*, v. 50, n. 4, p. 525-34, Dec 1999. ISSN 0867-5910 (Print).

Filippone JD, Bisognano JD. Baroreflex stimulation in the treatment of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 403-408.

Furchgott, R. F.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, v. 3, n. 9, p. 2007-18, Jul 1989. ISSN 0892-6638 (Print).

Furlan, R., Guzzetti, S., Crivellaro, W., Dassi, S., Tinelli, M., Baselli, G., Cerutti, S., Lombardi, F., Pagani, M., and Malliani, A. (1990). Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and its variabilities in ambulant subjects. *Circulation*, 81:537-47.

Furness, J. B.; Marshall, J. M. Correlation of the directly observed responses of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. *J Physiol*, v. 239, n. 1, p. 75-88, May 1974. ISSN 0022-3751.

Gassler JP, Lynch PS, Bisognano JD. The role of baroreflex activation therapy in sympathetic modulation for the treatment of resistant hypertension. *Heart Br Card Soc* 2012; 98: 1689-1692.

Georgakopoulos D, Little WC, Abraham WT, Weaver FA, Zile MR. Chronic baroreflex activation: a potential therapeutic approach to heart failure with preserved ejection fraction. *J Card Fail* 2011; 17: 167-178.

Griffith LS, Schwartz SI. Reversal of renal hypertension by electrical stimulation of the carotid sinus nerve. *Surgery* 1964; 56: 232-239.

Guzzetti S, Dassi S, Pecis M, Casati R, Masu AM, Longoni P, Tinelli M, Cerutti S, Pagani M, Malliani A. Altered pattern of circadian neural control of heart period in mild hypertension. *J Hypertens* 9 (9): 831-838, 1991.

Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della Bella P, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112: 465-470.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed.,2006.

Hallback, M. Consequence of social isolation on blood pressure, cardiovascular reactivity and design in spontaneously hypertensive rats. 1975. *Acta Physiol Scand*. 93(4):455-65.

Heusser K, Tank J, Luft FC, Jordan J. Baroreflex failure. *Hypertension* 2005; 45: 834-839.

Heusser K, Tank J, Engeli S, Diedrich A, Menne J, Eckert S, et al. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension* 2010; 55: 619-626.

Hildebrandt DA, Irwin ED, Cates AW, Lohmeier TE. Regulation of renin secretion and arterial pressure during prolonged baroreflex activation: influence of salt intake. *Hypertension* 2014; 64: 604-609.

Hirai T, Musch TI, Morgan DA, Kregel KC, Claassen DE, Pickar JG, Lewis SJ and Kenney MJ. Differential sympathetic nerve responses to nitric oxide synthase inhibition in anesthetized rats. *Am J Physiol* 269: R807-R813, 1995.

Holder, L. K., J. F. Wernicke, and W. B. Tarver. 1992. "Treatment of Refractory Partial Seizures: Preliminary Results of a Controlled Study." *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 15 (10 Pt 2): 1557-71.

Hyndman, B., Kitney, R., and Sayers, B. (1971). Spontaneous rhythms in physiological control systems. *Nature*, 233:339-341. hypertensive rat. *Circ Res*, 38 (suppl II):21-29.

Illig KA, Levy M, Sanchez L, Trachiotis GD, Shanley C, Irwin E, et al. An implantable carotid sinus stimulator for drug-resistant hypertension: surgical technique and short-term outcome from the multicenter phase II Rheos feasibility trial. *J Vasc Surg* 2006; 44: 1213-1218.

Ishitani, L.H., et al., [Socioeconomic inequalities and premature mortality due to cardiovascular diseases in Brazil]. *Rev Saude Publica*, 2006. 40(4): p. 684-91.

Judy, W., Watanabe, A., Henry, D., Besch Jr, H., Murphy, W., and Hockel, G. (1976). Sympathetic nerve activity: Role in regulation of blood pressure in the spontaneously

Judy, W., Watanabe, A., Henry, D., Besch Jr, H., Murphy, W., and Hockel, G. (1976). Sympathetic nerve activity: Role in regulation of blood pressure in the Spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*, 38 (suppl II):21–29.

Katayama PL, Castania JA, Dias DPM, Patel KP, Fazan R, Salgado HC. Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats. *Hypertension* 2015; 66: 598-603.

Kleiger, R., Miller, J., Bigger, J. J., and Moss, A. (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 59:256–262.

Lais, L., Bhatnagar, R., and Brody, M. (1974). Inhibition by dark adaption of the progress of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*, 34/35 (suppl I):155–160.

Lohmeier TE, Barrett AM, Irwin ED. Prolonged activation of the baroreflex: a viable approach for the treatment of hypertension? *Curr Hypertens Rep* 2005; 7: 193-198.

Lohmeier TE, Dwyer TM, Irwin ED, Rossing MA, Kieval RS. Prolonged activation of the baroreflex abolishes obesity-induced hypertension. *Hypertension* 49: 1307–1314, 2007.

Lohmeier TE, Iliescu R. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. *Physiol Bethesda Md* 2015; 30: 148-158.

Luan, Song, and Timothy G. Constandinou. 2014. "A Charge-Metering Method for Voltage-Mode Neural Stimulation." *Journal of Neuroscience Methods* 224 (March): 39–47. doi:10.1016/j.jneumeth.2013.11.028.

Lundin, S., Ricksten, S., and Thorén, P. (1984). Renal sympathetic activity in Spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand*, 120:265–272.

Madershahian N, Scherner M, Müller-Ehmsen J, Halbach M, Hickethier T, Velden R, et al. Baroreflex activation therapy in patients with pre-existing implantable cardioverter-defibrillator: compatible, complementary therapies. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol* 2014; 16: 861-865.

Malik M. Heart Rate Variability. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 1996; 1: 151-181.

Malliani, A. and Pagani, M. (1991). Spectral analysis of cardiovascular variabilities in the assessment of sympathetic cardiac regulation in heart failure. *Pharmacol Res*, 24 Suppl

Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F., and Cerutti, S. (1991). Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 84:482–492.

Mancia G, Parati G, Castiglioni P, Di Rienzo M. Effect of sinoaortic denervation on frequency-domain estimates of baroreflex sensitivity in conscious cats. *Am J Physiol* 276 (6 Pt. 2): H1987-H1993, 1999.

Mcintyre, M.; Bohr, D. F.; Dominiczak, A. F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, v. 34, n. 4 Pt 1, p. 539-45, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print).

Mésangeau D, Laude D, Elghozi JL. Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability. *Cardiovasc Res* 45 (4): 889-899, 2000.

Ministério da Saúde, Brasil. Sistema de informação sobre mortalidade. Brasília: MS 2004.

Montano N, Cogliati C, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkiewicz K, Abboud FM, Birkett C, Somers VK. Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. *Circulation*. 1998 Oct 6;98(14):1394-9.

Morris SM Jr, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1994 Jun;266(6 Pt 1):E829-39. Review.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977 Jul;41(1):19-26

Nasjletti A, Malik KU. Interrelations between prostaglandins and vasoconstrictor hormones: contribution to blood pressure regulation. *Fed Proc*. 1982 Jun;41(8):2394-9.

Neistadt A, Schwartz SI. Effects of electrical stimulation of the carotid sinus nerve in reversal of experimentally induced hypertension. *Surgery* 1967; 61: 923-931.

Okamoto, K. and Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J*, 27:282–293.

Organização Pan-Americana de Saúde, ed. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília: OPAS 2003.

Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension. *J Hypertens* 5 (1): 93-98, 1987a.

Parati G, Pomidossi G, Casadei R, Groppelli A, Trazzi S, Di Rienzo M, Mancia G. Role of heart rate variability in the production of blood pressure variability in man. *J Hypertens* 5 (5): 557-560, 1987b.

Pfeffer, M. and Frohlich, E. (1973). Hemodynamic and myocardial function in young and old normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 32/33 (suppl I):28–38.

Porta, a., Guzzetti, S., Montano, N., Furlan, R., Pagani, M., Malliani, a., and Cerutti, S. (2001). Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 48(11):1282–91.

Porta, A., Tobaldini, E., Guzzetti, S., Furlan, R., Montano, N., and Gneccchi-Ruscione, T. (2007). Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(1):H702–8.

Ramchandra R, Barret CJ, Guild SJ, McBryde F, Malpas SC. Role of renal sympathetic nerve activity in hypertension induced by chronic nitric oxide inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1479-R1485, 2007.

Rossignol P. Carotid barostimulation in the treatment of resistant hypertension. *Nephrol Ther.* 2016 Apr;12 Suppl. 2016.

Robertson D, Hollister AS, Biaggioni I, Netterville JL, Mosqueda-Garcia R, Robertson RM. The diagnosis and treatment of baroreflex failure. *N Engl J Med* 1993; 329: 1449-1455.

Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS and Levi R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res* 70: 607-611, 1992.

Salgado HC, Barale AR, Castania JA, Machado BH, Chapleau MW, Fazan R. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H593-600.

Sayers, B. (1973). Analysis of heart rate variability. *Ergonomics*, 16:17–32.

Scheffers IJM, Kroon AA, Schmidli J, Jordan J, Tordoir JJM, Mohaupt MG, et al. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 1254-1258.

Schmidli J, Savolainen H, Eckstein F, Irwin E, Peters TK, Martin R, et al. Acute device-based blood pressure reduction: electrical activation of the carotid baroreflex in patients undergoing elective carotid surgery. *Vascular* 2007; 15: 63-69.

Smith, S.C., Jr., et al., Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the World Heart and Stroke Forum. *Circulation*, 2004. 109(25): p. 3112-21.

Stauss HM, Moffit JA, Chapleau MW, Abboud FM, Johnson AK. Baroreceptor reflex sensitivity estimated by sequence technique is reliable in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (1): H482-H483, 2006.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 93:1043–1065.

Tordoir JHM, Scheffers I, Schmidli J, Savolainen H, Liebeskind U, Hansky B, et al. An implantable carotid sinus baroreflex activating system: surgical technique and short-term outcome from a multi-center feasibility trial for the treatment of resistant hypertension. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg* 2007; 33: 414-421.

Trippodo, N. and Frohlich, E. (1981). Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. *Circ Res*, 48:309–319.

Tsai CY, Su CH, Leu S, Chang AY, Chan JY, Chan SH. Endogenous vascular endothelial growth factor produces tonic facilitation of cardiac vagal baroreflex via fetal liver kinase-1 in medulla oblongata. *Int J Cardiol*. 2015;187:421-5.

Wang T1, Kobayashi Y, Nabika T, Takabatake T. Enhanced sympathetic control of renal function in rats congenic for the hypertension-related region on chromosome 1. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005.

World Health Organization, ed. The world health report 2003: shaping the future. Geneva: WHO 2003.

Wustmann K, Kucera JP, Scheffers I, Mohaupt M, Kroon AA, de Leeuw PW, et al. Effects of chronic baroreceptor stimulation on the autonomic cardiovascular regulation in patients with drug-resistant arterial hypertension. *Hypertension* 2009; 54: 530-536.

Yamori, Y. (1984). Development of the spontaneously hypertensive rat (shr) and of various spontaneous rat models, and their implications. In de Jong, W., editor, *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension, volume 4*, pages 224–239. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

Yamori, Y., Matsumoto, M., Yamabe, H., and Okamoto, K. (1969). Augmentation of spontaneous hypertension by chronic stress in rats. *Jap Circ J*, 33:399–409.

Zanchetti A, Mancia G. Blood pressure and organ damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 10 (6 Suppl): S111-S118, 1987.

Zannad F, Stough WG, Mahfoud F, Bakris GL, Kjeldsen SE, Kieval RS, et al. Design considerations for clinical trials of autonomic modulation therapies targeting hypertension and heart failure. *Hypertension* 2015; 65: 5-15.

Zhong, H.; Minneman, K.P. α_1 - Adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*. 375, 261-276. 1999.

Zucker IH. Novel mechanisms of sympathetic regulation in chronic heart failure. *Hypertension* 2006; Dec 48:1005-1011.

Manuscrito

Hemodynamic responses to electrical stimulation of the carotid sinus in conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats

Gean Domingos-Souza, Fernanda Machado Santos-Almeida, Jaci Airton Castania, Luiz Eduardo Virgilio Silva, Daniel Penteado Martins Dias, H elio Cesar Salgado, Rubens Fazan Jr.

Department of Physiology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Running Head: Electrical stimulation of carotid sinus in rats

Corresponding author:

Rubens Fazan Junior, M.D., Ph.D.

Department of Physiology

School of Medicine of Ribeirão Preto-USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Phone: +55 16 33153331

E-mail: rfazan@usp.br

ABSTRACT

Aims - Baroreflex activation therapy has been used to attenuate arterial pressure in resistant hypertension. We evaluated the hemodynamic responses to short and prolonged electrical activation of the carotid sinus (CS) in conscious normotensive and SHR.

Main Methods - Under anesthesia, the subjects were implanted with electrodes around the CS, encompassing the CS nerve, and a catheter into the femoral. On the following day, the arterial pressure (AP) and heart rate (HR), were subjected to a set of short-term electrical stimulation (1 mA, 1 ms), with different frequencies (15, 30, 60 and 90 Hz), followed by a prolonged period (60 min) of continuous CS stimulation (1 mA, 1 ms, 30 Hz). Short-term electrical stimulation of CS elicited a prompt fall in AP that was more pronounced in SHR (Δ 16 to 48 mmHg) as compared to Wistar (N=10) counterparts (Δ 18 to 19 mmHg). The magnitude of AP response was frequency dependent in SHR. Bradycardia was also elicited by electrical stimulation of the CS that was similar both groups (Δ 17 to 44 BPM).

key findings - Prolonged stimulation elicited greater fall in AP of SHR (-38 ± 9 vs. -17 ± 6 mmHg in Wistar rats). HR variability was evaluated, showing a reduction in the power of the AP spectra in the LF band (3.6 ± 0.3 vs. 0.7 ± 0.1 mmHg²) in normotensive rats.

Significance - CS stimulation decreased AP and HR in wistar and SHR and elicited an increase of parasympathetic modulation of the heart in Wistar.

Keywords: Baroreflex, hemodynamics, electrical stimulation, carotid sinus nerve; hypertension; heart rate variability.

BACKGROUND

Chronic hypertension is commonly associated with attenuation of baroreflex sensitivity, and the electrical activation of the baroreceptors denotes an innovative approach for controlling arterial pressure (AP) in patients with resistant hypertension (Navaneethan et al., 2009). This electroceutical approach was proposed in the early 60s, given the limitation of pharmacological therapy for treating hypertension at the time (Griffith and Schwartz, 1964; Neistadt and Schwartz, 1967), but was posteriorly disused. Nowadays, devices specially designed to stimulate the carotid sinus (CS) have been used for treating hypertensive patients resistant to pharmacological therapy (Bisognano et al., 2011; de Leeuw et al., 2015; Heusser et al., 2010). More recently, electrical stimulation of CS has emerged as a therapeutic tool in the management of heart failure as well (Alnima et al., 2012a; DiBona, 2013; Doumas et al., 2014).

In our laboratory, short-term - seconds to minutes - electrical stimulation of the aortic depressor nerve, the afferent pathway of the aortic baroreflex, in conscious normotensive (De Paula et al., 1999; Machado et al., 2000) or spontaneously hypertensive rats (SHR) (Durand et al., 2011; Salgado et al., 2007) have provided valuable information regarding the mechanisms of reflex regulation of AP and heart rate (HR). Recently, we have demonstrated that electrical stimulation of the CS, encompassing the CS nerve, was effective in producing hypotensive responses in normotensive rats (Katayama et al., 2015). However, the optimal stimulation parameters, as well as the long-term effects of CS stimulation remain open questions.

In the current study, we have applied short (20 s) as well as prolonged (60 min) electrical activation of the CS to evaluate the hemodynamic responses to this maneuver in conscious freely-moving normotensive Wistar and SHR.

METHODS

Animals

Experiments were carried out in male normotensive Wistar rats and SHR, aged 18-20 weeks, averaging 300 g of body weight, supplied by the Animal Facility of the University

of São Paulo at the Campus of Ribeirão Preto. The animals were fed a standard chow diet and had free access to tap water, under controlled temperature (22 °C) and a 12-12 h dark-light cycle. All experimental protocols performed in the current study were approved by the Committee on Animal Research and Ethics of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (Protocol 023/2013-1).

Surgical procedures

Under the anesthesia of a mixture of ketamine and xylazine (50 and 10 mg/kg, respectively, ip) the rats had their CS carefully isolated under the view of a surgical microscope (M902MFZ, DFVasconcelos, São Paulo, SP, Brazil). A pair of stainless steel (0.008 inches bare, 0.011 inches Teflon coated; A-M Systems, Sequim, WA, USA) electrodes was placed around the CS, including the carotid sinus nerve, separated by approximately 2 mm, and isolated from adjacent structures with a cold-polymerizing resin (Kwik-Sil, World Precision Instruments Inc, Sarasota, Florida, USA) (Katayama et al., 2015). Finally, the animals were instrumented with a polyethylene catheter into the left femoral artery. The electrodes, attached to a small plug (GF-6, Microtech, Boothwyn, PA, USA) were exteriorized in the interscapular region of the rats together with the arterial catheter.

All surgical procedures were performed under aseptic conditions and all material implanted was previously sterilized. At the end of the surgical procedure, the animals received analgesic (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg of body weight, im) and antibiotic (*Pentabiótico Veterinário* 0.7 mL/kg of body weight, im). The rats were allowed to recover in individual cages until the beginning of the experimental protocol, twenty-four hours later.

Experimental protocols

Protocol 1: Electrical impedance of the carotid sinus

One group of normotensive rats (N=14) was used to measure the electrical impedance of the circuit formed by the electrodes attached to the CS. For this purpose, the electrodes were connected, in parallel, to an electrical pulse generator (Estimulador Elétrico, AVS Projetos Especiais, São Carlos, SP, Brazil) and an oscilloscope (Agilent, DSO3062A, Santa Clara, CA, USA). Square pulses with 1 ms of width and current of 1

mA were applied to the CS during 1 min. The voltage measured at the CS in response to pulses at fixed current (1 mA) was used to determine the electrical impedance of the circuit formed by the electrodes implanted in the CS.

Protocol 2: Electrical stimulation of the carotid sinus

Twenty-four hours after the surgical procedures the animals were taken to recording room and had their arterial catheter connected to a pressure transducer (MLT0380/D, ADInstruments, Sydney, Australia). Animals were allowed a period of 30 to 60 min to acclimatize to the environment. The AP signal was amplified (ML110, ADInstruments, Bella Vista, Australia) and fed to an IBM/PC equipped with an analog-to-digital interface (Power Lab 4/40, ADInstruments, Bella Vista, Australia). The AP was continuously sampled (2 kHz) and HR were calculated online from the AP signal. Following the recording of baseline conditions, each rat was subjected to a set of short-term (20 s) electrical stimulations of the CS with square pulses (1 ms length, 1 mA electrical current) at four different frequencies (15, 30, 60 and 90 Hz). The sequence of frequencies was randomly applied and a minimum period of 5 min between stimuli was allowed for hemodynamic recovery. 10 minutes after the set of short-term stimulus, a prolonged period (60 min) of stimulation (1 mA, 1 ms at 30 Hz) was applied.

Electrical stimulation of the CS did not induce noticeable behavioral or stressful responses in any of the animals studied. Some rats implanted with the electrodes were not responsive to electrical stimulation, probably due to technical problems with the implant of the electrodes. Seldom, a few rats showed slight contractions of the neck muscles in response to CS stimulation. When this outcome happened, the electrical stimulation was immediately suspended, and the rat was not further evaluated and excluded from the study.

Heart rate and arterial pressure variability

Beat-by-beat time series of systolic AP and pulse interval (PI) values were generated from AP recordings using a custom computer software (Blood Pressure Module for LabChart, ADInstruments, Bella Vista, Australia). All PI and systolic AP variability indices were calculated from 5 min of baseline recordings as well as during the last 5 min

of the prolonged stimulation period. Time domain and nonlinear dynamics analysis were performed using plugins of the computer software JBioS (Duque et al., 2013), while spectral analysis was carried out using the computer software CardioSeries (www.danielpenteadoc.com).

Time domain analysis: HRV was assessed in the time domain by means of the calculation of standard deviation of normal-to-normal PI values (SDNN) and root mean square of successive differences between PI (RMSSD). AP variability was assessed by the standard deviation (SD) of beat-by-beat systolic AP values (Malik, 1996).

Spectral analysis: Beat-by-beat time series of PI and systolic AP values were interpolated at 10 Hz and divided into half-overlapping segments of 512 points. An experienced researcher visually inspected interpolated data, and segments with transients or artifacts were discarded. Hanning window was applied to each segment of interpolated data, and spectra were calculated by Fast Fourier Transform (FFT) and integrated into low- (LF: 0.2 to 0.75 Hz) and high-frequency bands (HF: 0.75 to 3.0 Hz). The power of the spectra is shown in absolute (ms^2 or mmHg^2) and normalized units (nu). As previously described (Billman, 2011), normalized values were obtained following calculation of the percentage of LF and HF power apropos of total power of the spectrum minus the power at the very low-frequency band (VLF: <0.02 Hz). The LF/HF ratio was taken as a sympathovagal balance index of PI variability (Montano et al., 1994).

Analysis of symbolic dynamics: Symbolic analysis was performed as described previously (Guzzetti et al., 2005; Porta et al., 2001). Briefly, the range of values of PI series was divided into six equally spaced segments and the values were transformed into symbols (from 0 to 5), based on the segment they belong. Following, each combination of 3 consecutive symbols were classified into one of the following patterns: 0V, sequences with no variation, when all three symbols were equal. 1V, sequences with one variation, when two consecutive symbols were identical and the remnant was different, and 2V, sequences with two variations, when all the 3 symbols are different. Sequences with 2 variations were additionally classified in 2LV, when the 2 changes are in the same

direction (increasing, or decreasing) and 2UV, when the changes are in the opposite direction. The percentage of patterns 0V and 2UV was computed for the whole series (Guzzetti et al., 2005; Porta et al., 2001). The fundament of variation patterns is based on different characteristics of autonomic modulation of the heart, i.e. slow modulation of sympathetic (less variation of PI intervals in a period of time) and fast modulation of parasympathetic (more variation of PI in a period of time) (Kollai and Koizumi, 1979; Pickering and Davies, 1973). Therefore, 0V pattern occurrence reflects sympathetic modulation while 2V pattern reflects vagal modulation (Guzzetti et al., 2005).

In case of systolic AP, only 0V was considered and taken as an index of the sympathetic modulation to arterial vessels.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA one-way) for repeated measures, followed by Newman-Kews post *hoc* was used to compare different frequencies (15, 30, 60 and 90 Hz).

Two-way analysis of variance (ANOVA two-way) adjusted for repeated measures, followed by Newman-Kews post *hoc* was used to compare AP and HR between the normotensive and SHR groups during prolonged (60 min) stimulation of the CS. The PI, HR, AP and time-frequency domain indices were compared between groups using analysis of variance for nonparametric data (ANOVA on Ranks). When differences were found, the data were compared in pairs by Dunn's test. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Electrical impedance of the carotid sinus

A current pulse of 1 mA applied to the CS generated a voltage change within 4.3 and 7.2 V, averaging 5.0 ± 0.4 V. The electrical impedance calculated was 5.0 ± 0.4 k Ω for the entire group.

Hemodynamics

The mean AP was markedly higher in SHR (178 ± 4 mmHg) than in normotensive Wistar rats (103 ± 3 mmHg), while the HR was found similar in both groups (346 ± 16 and 369 ± 8 bpm in Wistar and SHR, respectively). Figure 1 illustrates recordings of AP and HR during electrical stimulation of CS in one representative animal of each group (Wistar and SHR).

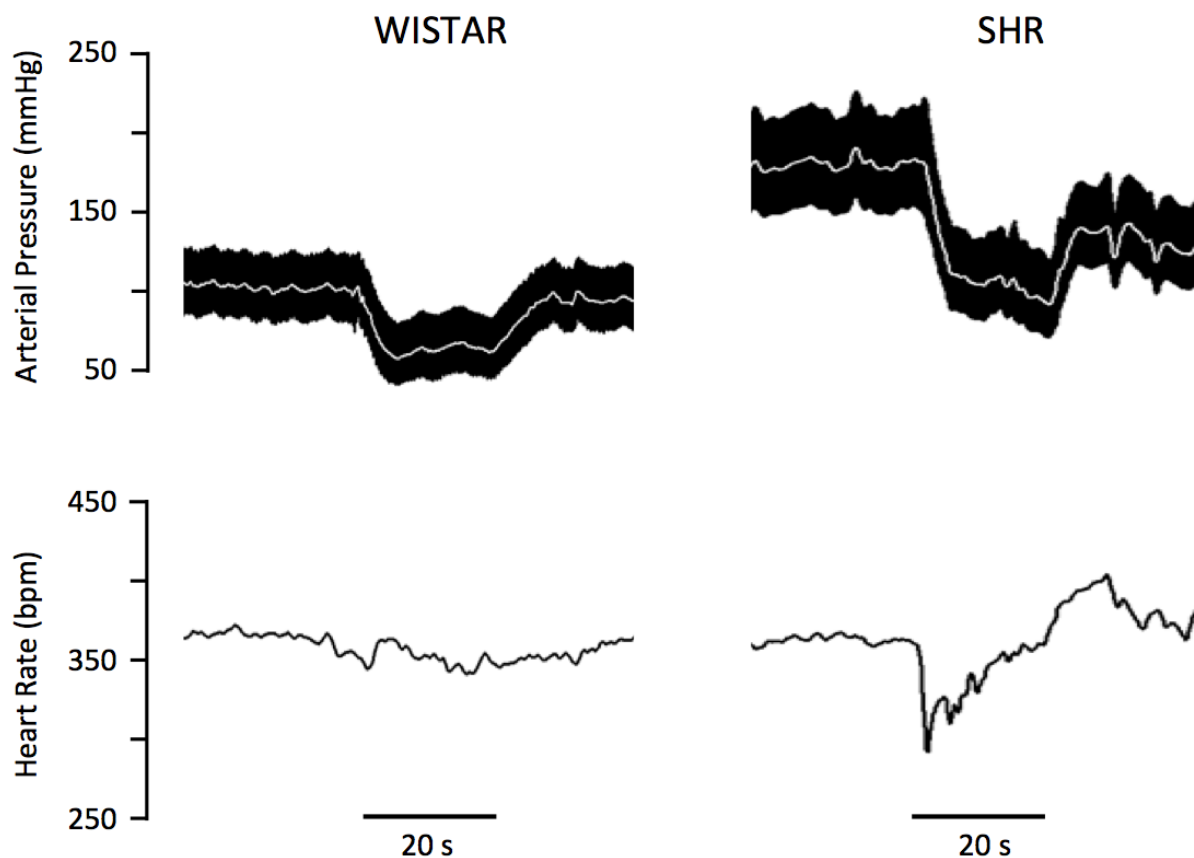


Figure 1. Representative traces showing arterial pressure (upper panel), and heart rate (HR, lower panel) responses to 20 s electrical stimulation (black line: 1 mA, 1 ms and 60 Hz) of the left carotid sinus in conscious normotensive Wistar rat and spontaneously hypertensive rat (SHR).

Short-term electrical stimulation of the CS elicited a marked fall in mean AP, accompanied by a bradycardic response, in both normotensive Wistar and SHR (Figure 2). As shown in figure 2, the magnitude of the hypotensive response to CS stimulation was higher in SHR at frequencies 30, 60 and 90 Hz. Moreover, a frequency-dependent pattern for the fall in MAP was observed only in SHR. HR responses to CS stimulation

were found similar between groups, not exhibiting a frequency-dependent pattern.

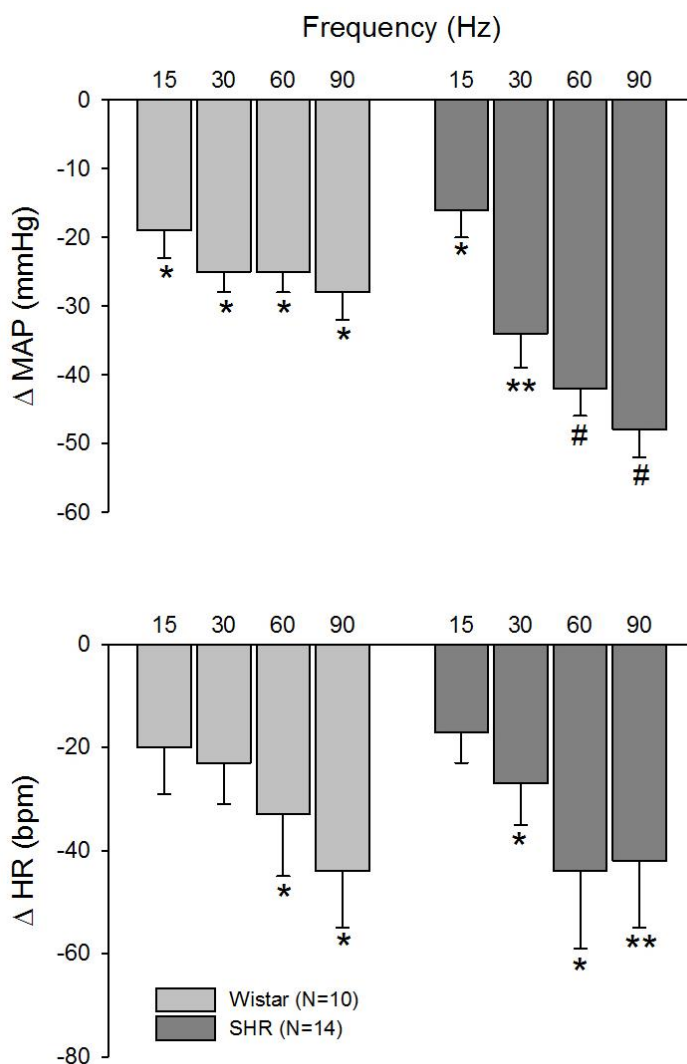


Figure 2: Mean arterial pressure (MAP, upper panel) and heart rate (HR, lower panel) responses to electrical stimulation (1 mA, 1 ms and 15, 30, 60 or 90 Hz, during 20s) of the left carotid sinus in conscious normotensive Wistar (left, n=10) and spontaneously hypertensive rats (SHR, right; n=14). Results expressed as mean \pm SEM. n = number of rats. * P<0.05 indicates delta different from zero; ** P<0.05 as compared to 15 Hz; # P<0.05 as compared to 30 Hz.

Prolonged (60 min) stimulation of the CS elicited a sustained fall in mean AP in both groups during the entire period of stimulation (Figure 3). The SHR showed a greater hypotensive response to sustained stimulation of the CS ($\Delta = -38 \pm 9$ vs. -15 ± 5 mmHg in normotensive Wistar rats). No difference in the magnitude of the bradycardic response was observed during prolonged stimulation of the CS in both groups.

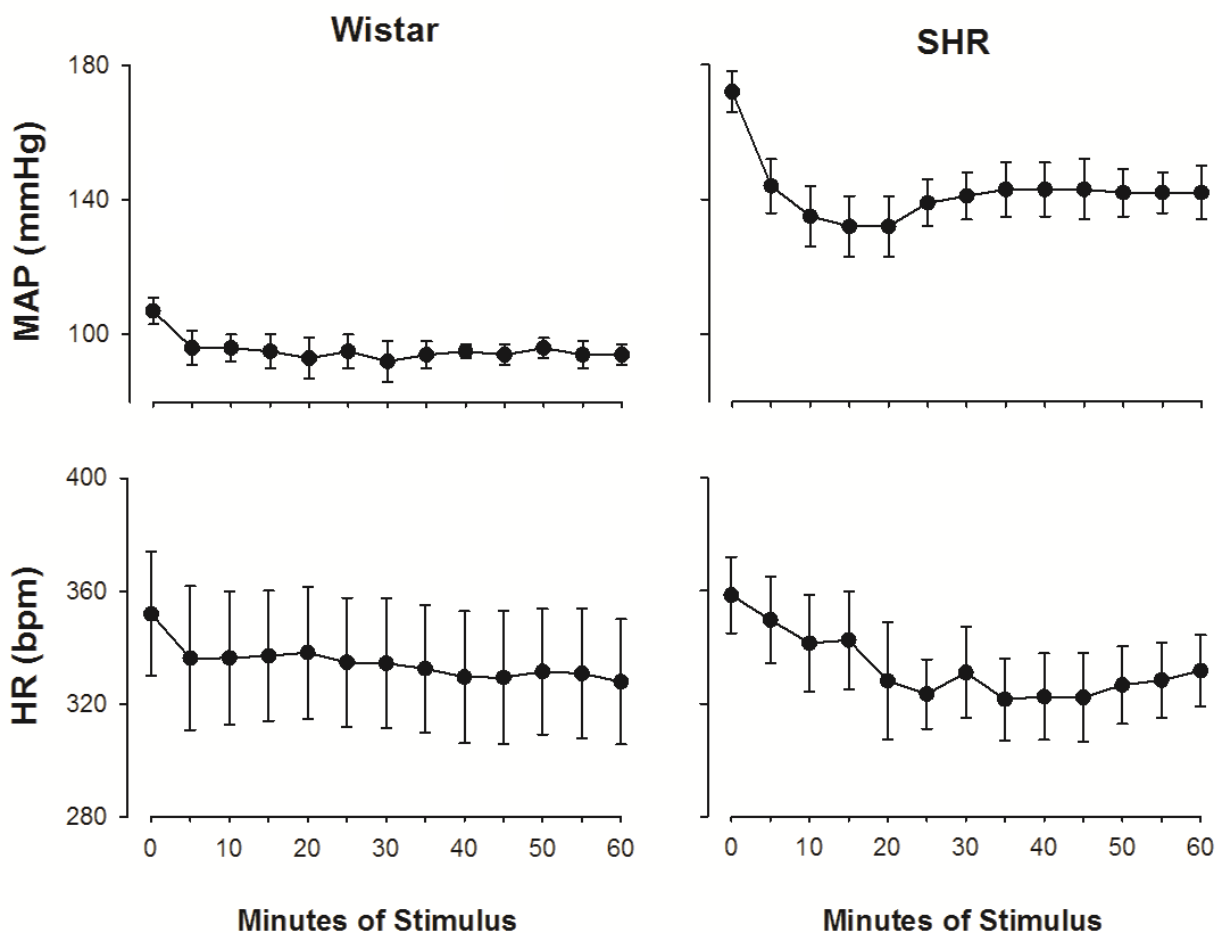


Figure 3: Mean arterial pressure (MAP, upper panels) and heart rate (HR, lower panels) responses observed during long-last (60 min) electrical stimulation (1 mA, 1 ms, 30 Hz) of the left carotid sinus in Wistar (left, $n = 5$) and SHR (right $n = 9$) conscious rats. Results are expressed as mean \pm SEM. $n =$ number of rats. All MAP values are different in comparison to baseline. No difference was found for HR as compared to baseline. $P < 0.001$.

Heart rate and arterial pressure variability

Table 1 shows HR and AP variability indices calculated from baseline recordings, and at the end of the prolonged electrical stimulation period. Cardiovascular variability analysis revealed that stimulation of the CS elicited an increase in the occurrence of 2UV sequences in PI values (symbolic analysis) as well as a reduction in the power of the LF band of the systolic AP spectrum only in control rats. As shown in Table 1, no other index

of cardiovascular variability was changed by the stimulation of CS in neither normotensive Wistar or SHR.

Table 1: Effects of one hour electrical stimulation (1 mA, 1 ms, 30 Hz) of the left carotid sinus on heart rate and systolic arterial pressure variability in conscious normotensive Wistar rats and SHR.

	Wistar (N = 5)		SHR (N = 9)	
	Basal	Stimulus	Basal	Stimulus
Heart Rate Variability				
SDNN, ms	6.4 ± 1.6	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.6	5.7 ± 0.6
RMSSD, ms	5.4 ± 0.5	6.1 ± 0.9	4.6 ± 0.5	6.0 ± 1.0
LF, nu	17.2 ± 4.6	7.4 ± 1.4	19 ± 2.7	18 ± 2.2
HF, ms ²	7.8 ± 2.0	9.5 ± 2.6	7.7 ± 1.0	14.1 ± 4.2
LF/HF	0.20 ± 0.07	0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.05	0.24 ± 0.04
0V, %	16 ± 2	11 ± 2	18 ± 2	15 ± 1
2UV, %	37 ± 3	45 ± 4 *	33 ± 2	35 ± 2
Arterial Pressure Variability				
SD, mmHg	6.7 ± 0.5	6.0 ± 1.4	7.3 ± 0.8	7.8 ± 0.6
LF, mmHg ²	3.6 ± 0.3	0.7 ± 0.1 *	6.8 ± 1.7	3.5 ± 0.8
0V, %	36 ± 4	24 ± 3	32 ± 6	29 ± 6

Values are means ± SEM. SDNN: standard deviation of RR intervals; RMSSD: root mean square of successive differences in RR interval; LF, low frequency; HF, high frequency; nu, normalized units; 0V and 2UV: indices calculated by symbolic analysis; Basal: five minutes of basal period; Stimulus: five minutes at the end of stimulation period. *P<0.05 as compared with basal.

DISCUSSION

Since the electrical stimulation of the CS provides a novel approach to assessing the role of neural mechanisms in cardiovascular regulation (Hildebrandt et al., 2014) and it has also been considered a potential therapy for pathological conditions such as refractory hypertension (Fallick et al., 2011; Georgakopoulos et al., 2011) and heart failure (Alnima et al., 2012a; DiBona, 2013; Dumas et al., 2014), we highlight the importance of the knowledge of this maneuver in rats in view of the translational role of this procedure.

Several studies have been conducted to assess the effects of peripheral nerve stimulation as a treatment for diverse health conditions, in particular for those that no other therapy is available or conventional treatments are not entirely functional (Slavin, 2015). The electrical stimulation of the vagus nerve, for example, has been employed as a treatment for depression (Kennedy and Giacobbe, 2007), migraine (Mauskop, 2005), epilepsy (“A randomized controlled trial of chronic vagus nerve stimulation for treatment of medically intractable seizures. The Vagus Nerve Stimulation Study Group,” 1995), chronic heart failure (De Ferrari et al., 2011), morbid obesity (Ikramuddin et al., 2014), inflammation (Pavlov and Tracey, 2006), among others. The electrical stimulation of other peripheral nerves has been also employed successfully: occipital nerve stimulation as a treatment for migraine (Popeney and Aló, 2003), hypoglossal nerve stimulation as a treatment for obstructive sleep apnea (Eastwood et al., 2011) and carotid sinus stimulation as a alternative treatment for resistant hypertension (Ingrid J M Scheffers et al., 2010).

For the best of our knowledge, the earliest employment of peripheral nerve stimulation was in 1962, when the mandibular division of the trigeminal nerve of patients was implanted with platinum electrodes connected to a radio-frequency powered device (Shelden, 1966). Following the study from Shelden, advances into the technology field allowed fully implantable devices to be designed (Racz et al., 1988), dispensing the need of having an external coil attached to the skin to operate, as usual for radiofrequency powered devices. Later, multipolar paddle leads were added to implantable devices, and the possibility of programming the device through the skin (i.e. telemetry technology) (Strege et al., 1994).

Although electrical stimulation of baroreceptor afferent pathways is not a new approach in either experimental animals (Hildebrandt et al., 2014; Lohmeier et al., 2005; Zannad et al., 2015) or humans (Alnima et al., 2013; Filippone and Bisognano, 2007; Gassler et al., 2012; Illig et al., 2006; Ingrid J. M. Scheffers et al., 2010; Schmidli et al., 2007; Tordoir et al., 2007), most of the studies employed electrical stimulation with constant voltage to the CS or aortic depressor nerve. Our results revealed that the impedance of the CS, chronically instrumented with a pair of electrodes, varies markedly from one rat to another.

The effects of therapies based on electrical stimulation of peripheral nerves rely on

the generation of action potentials by nerves in response to the flow of electrical current (Slavin, 2015). There is a unique relationship between current and recruited fibers, as well as the choice of stimulation parameters and success of electrical stimulation. The distance between the electrode and the nerve fibers affects the threshold stimulation current necessary to depolarize the fiber and generate an action potential (McIntyre et al., 2002; Slavin, 2015). It was shown that when the distance varies from 4,000 to 8,000 μm , between the electrodes and the nerve, the electrical current necessary for the same extent of nerve stimulation is nearly five times higher.

Despite all the recent advances in the electronic field and development of highly programmable neurostimulators, which allows a substantial range of stimulation settings, the basis for choosing stimulation parameters needs to be amended (Slavin, 2015). Usually, stimulation protocols include the electrical current (mA), frequency (Hz), pulse width (μs), “on” and “off” periods (seconds or minutes) (Holder et al., 1992). Since the resistance (impedance) of tissues may vary, the use of constant current settings, instead of constant voltage, contributes to better standardization of stimulation intensity across subjects within the study and across studies. Nevertheless, the use of constant current stimulation relies on the need for enough electrical tension to maintain the required current (Luan and Constandinou, 2014). Therefore, the choice of parameters should take into account the purpose of the therapy and its longevity prospect. Considering that the depolarization of CS is mainly determined by the electrical current applied to it, the electrical stimulation of this structure at a fixed voltage may lead to marked different levels of baroreflex activation. In other words, we do believe that the employment of electrical stimulation with fixed current contribute to more consistent (uniform) activation of the CS among chronically instrumented rats.

The fall in AP elicited by the stimulation of the CS was more pronounced in SHR, regardless the duration of the stimuli (20 s or 60 min). This finding is in line with a previous observation from our laboratory showing that the hypotensive response to electrical stimulation of the aortic nerve (aortic baroreceptors pathway) is higher in SHR as compared to normotensive Wistar rats (Salgado et al., 2007).

The magnitude of the hypotensive response to CS stimulation followed a frequency dependent pattern in SHR but not in Wistar rats. HR did not fall in a frequency dependent

pattern in either strain of rats studied. Previous studies from our laboratory (De Paula et al., 1999; Salgado et al., 2007) showed that stimulation of the aortic depressor nerve in conscious rats induced a frequency dependent hypotension and bradycardia.

According to a number of studies, continuous electrical stimulation might disturb the function of peripheral or central components of the baroreflex causing a condition resembling baroreflex failure (Heusser et al., 2005; Robertson et al., 1993). However, stimulation of CS did not impair baroreflex function, as judged by different methods (Heusser et al., 2010). Moreover, a study in patients with resistant hypertension demonstrated that the voltage-dependent reduction of AP was preserved after at least one year of continuous electrical stimulation of the CS (Alnima et al., 2012b).

In addition to the fall in AP and HR, it is known that electrical stimulation of carotid baroreceptors evokes coordinated reduction in sympathetic outflow to the heart, vasculature and kidneys (Esler et al., 2010; Lohmeier and Iliescu, 2015), as well as increases of cardiac parasympathetic activity (de Leeuw et al., 2015; Heusser et al., 2010; Madershahian et al., 2014). Our study is innovative because, to our knowledge, there is no data showing consensus in the parameters, such as frequency and electrical current or voltage, chosen for the application of CS electrical stimulation approaches.

Cardiovascular variability response

We evaluated the PI and systolic pressure variability in time and frequency domains, as well as by nonlinear approaches, before and at the end of prolonged stimulation of CS. In normotensive rats, only the percentage of 2UV patterns in PI series and the power of the LF band of the AP spectra were affected by stimulation of CS. Studies conducted in humans with resistant hypertension showed that electrical stimulation of CS altered HRV assessed in frequency domain, indicating cardiovascular changes consistent with inhibition of sympathetic and increase of parasympathetic modulation (Heusser et al., 2010; Wustmann et al., 2009). In this context, it is important to mention that, spectral analysis of HRV and also percentage of 0V patterns from symbolic analysis showed a marked tendency ($p < 0.1$) to changes, suggesting that stimulation of CS cause reduction of sympathetic and increase parasympathetic cardiac modulation (Table 1). The absence of significant differences in SHR might be explained by a concomitant stimulation of

carotid chemoreceptors during CS electrical stimulation, which may have caused an opposite effect (increase in sympathetic activity) to the baroreceptor stimulation (Heusser et al., 2010). Moreover, the deactivation of aortic and contralateral carotid baroreceptors during the marked fall in AP, particularly in SHR, might attenuate the change in sympathovagal balance during stimulation of CS.

CONCLUSION

In conclusion, electrical stimulation of CS produced a hypotensive and bradycardic response in both, normotensive rats and SHR. Nevertheless, SHR showed a markedly more pronounced hypertension. The magnitude of the hypotension was affected by the frequency of stimulation only in SHR. Moreover, long-term continuous CS stimulation promotes a decrease in the power of LF band of AP spectra of Wistar rats. These findings suggest that the electrical stimulation of CS was able to elicit inhibition of sympathetic modulation in normotensive rats. Finally, our results clearly show a therapeutic potential of electrical stimulation of baroreceptors pathway in the treatment of hypertension.

Funding: This work was supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant 2013/13269-8].

REFERENCES

1. A randomized controlled trial of chronic vagus nerve stimulation for treatment of medically intractable seizures. The Vagus Nerve Stimulation Study Group, 1995. . *Neurology* 45, 224–230.
2. Alnima, T., de Leeuw, P.W., Kroon, A.A., 2012a. Baroreflex activation therapy for the treatment of drug-resistant hypertension: new developments. *Cardiol. Res. Pract.* 2012, 587194. doi:10.1155/2012/587194
3. Alnima, T., de Leeuw, P.W., Kroon, A.A., 2012b. Baroreflex activation therapy for the treatment of drug-resistant hypertension: new developments. *Cardiol. Res. Pract.* 2012, 587194. doi:10.1155/2012/587194
4. Alnima, T., de Leeuw, P.W., Tan, F.E.S., Kroon, A.A., Rheos Pivotal Trial Investigators, 2013. Renal responses to long-term carotid baroreflex activation therapy in patients with drug-resistant hypertension. *Hypertension* 61, 1334–1339. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01159
5. Billman, G.E., 2011. Heart rate variability - a historical perspective. *Front. Physiol.* 2, 86. doi:10.3389/fphys.2011.00086
6. Bisognano, J.D., Bakris, G., Nadim, M.K., Sanchez, L., Kroon, A.A., Schafer, J., de Leeuw, P.W., Sica, D.A., 2011. Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled rheos pivotal trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 765–773. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.008
7. De Ferrari, G.M., Crijns, H.J.G.M., Borggrefe, M., Milasinovic, G., Smid, J., Zabel, M., Gavazzi, A., Sanzo, A., Dennert, R., Kuschyk, J., Raspopovic, S., Klein, H., Swedberg, K., Schwartz, P.J., 2011. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 32, 847–855. doi:10.1093/eurheartj/ehq391
8. De Leeuw, P.W., Alnima, T., Lovett, E., Sica, D., Bisognano, J., Haller, H., Kroon, A.A., 2015. Bilateral or unilateral stimulation for baroreflex activation therapy. *Hypertension* 65, 187–192. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04492
9. De Paula, P.M., Castania, J.A., Bonagamba, L.G., Salgado, H.C., Machado, B.H., 1999. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. *Am. J. Physiol.* 277, R31–38.
10. DiBona, G.F., 2013. Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension* 61, 556–560. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00633
11. Doumas, M., Faselis, C., Kokkinos, P., Anyfanti, P., Tsioufis, C., Papademetriou, V., 2014. Carotid baroreceptor stimulation: a promising approach for the management of resistant hypertension and heart failure. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 30–37.
12. Duque, J.J., Silva, L.E.V., Murta, L.O., 2013. Open architecture software platform for biomedical signal analysis. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 2013, 2084–2087. doi:10.1109/EMBC.2013.6609943

13. Durand, M. de T., Castania, J.A., Fazan, R., Salgado, M.C.O., Salgado, H.C., 2011. Hemodynamic responses to aortic depressor nerve stimulation in conscious L-NAME-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R418–427. doi:10.1152/ajpregu.00463.2010
14. Eastwood, P.R., Barnes, M., Walsh, J.H., Maddison, K.J., Hee, G., Schwartz, A.R., Smith, P.L., Malhotra, A., McEvoy, R.D., Wheatley, J.R., O'Donoghue, F.J., Rochford, P.D., Churchward, T., Campbell, M.C., Palme, C.E., Robinson, S., Goding, G.S., Eckert, D.J., Jordan, A.S., Catcheside, P.G., Tyler, L., Antic, N.A., Worsnop, C.J., Kezirian, E.J., Hillman, D.R., 2011. Treating Obstructive Sleep Apnea with Hypoglossal Nerve Stimulation. *Sleep* 34, 1479–1486. doi:10.5665/sleep.1380
15. Esler, M., Lambert, E., Schlaich, M., 2010. Point: Chronic activation of the sympathetic nervous system is the dominant contributor to systemic hypertension. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 109, 1996–1998; discussion 2016. doi:10.1152/jappphysiol.00182.2010
16. Fallick, C., Sobotka, P.A., Dunlap, M.E., 2011. Sympathetically mediated changes in capacitance: redistribution of the venous reservoir as a cause of decompensation. *Circ. Heart Fail.* 4, 669–675. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.961789
17. Filippone, J.D., Bisognano, J.D., 2007. Baroreflex stimulation in the treatment of hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 403–408. doi:10.1097/MNH.0b013e3282f01e4b
18. Gassler, J.P., Lynch, P.S., Bisognano, J.D., 2012. The role of baroreflex activation therapy in sympathetic modulation for the treatment of resistant hypertension. *Heart Br. Card. Soc.* 98, 1689–1692. doi:10.1136/heartjnl-2012-302366
19. Georgakopoulos, D., Little, W.C., Abraham, W.T., Weaver, F.A., Zile, M.R., 2011. Chronic baroreflex activation: a potential therapeutic approach to heart failure with preserved ejection fraction. *J. Card. Fail.* 17, 167–178. doi:10.1016/j.cardfail.2010.09.004
20. Griffith, L.S., Schwartz, S.I., 1964. REVERSAL OF RENAL HYPERTENSION BY ELECTRICAL STIMULATION OF THE CAROTID SINUS NERVE. *Surgery* 56, 232–239.
21. Guzzetti, S., Borroni, E., Garbelli, P.E., Ceriani, E., Della Bella, P., Montano, N., Cogliati, C., Somers, V.K., Malliani, A., Mallani, A., Porta, A., 2005. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 112, 465–470. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.518449
22. Heusser, K., Tank, J., Engeli, S., Diedrich, A., Menne, J., Eckert, S., Peters, T., Sweep, F.C.G.J., Haller, H., Pichlmaier, A.M., Luft, F.C., Jordan, J., 2010. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension* 55, 619–626. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140665
23. Heusser, K., Tank, J., Luft, F.C., Jordan, J., 2005. Baroreflex failure. *Hypertension* 45, 834–839. doi:10.1161/01.HYP.0000160355.93303.72
24. Hildebrandt, D.A., Irwin, E.D., Cates, A.W., Lohmeier, T.E., 2014. Regulation of renin secretion and arterial pressure during prolonged baroreflex activation: influence of salt intake. *Hypertension* 64, 604–609. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03788

25. Holder, L.K., Wernicke, J.F., Tarver, W.B., 1992. Treatment of refractory partial seizures: preliminary results of a controlled study. *Pacing Clin. Electrophysiol.* PACE 15, 1557–1571.
26. Ikramuddin, S., Blackstone, R.P., Brancatisano, A., Toouli, J., Shah, S.N., Wolfe, B.M., Fujioka, K., Maher, J.W., Swain, J., Que, F.G., Morton, J.M., Leslie, D.B., Brancatisano, R., Kow, L., O'Rourke, R.W., Deveney, C., Takata, M., Miller, C.J., Knudson, M.B., Tweden, K.S., Shikora, S.A., Sarr, M.G., Billington, C.J., 2014. Effect of reversible intermittent intra-abdominal vagal nerve blockade on morbid obesity: the ReCharge randomized clinical trial. *JAMA* 312, 915–922. doi:10.1001/jama.2014.10540
27. Illig, K.A., Levy, M., Sanchez, L., Trachiotis, G.D., Shanley, C., Irwin, E., Pertile, T., Kieval, R., Cody, R., 2006. An implantable carotid sinus stimulator for drug-resistant hypertension: surgical technique and short-term outcome from the multicenter phase II Rheos feasibility trial. *J. Vasc. Surg.* 44, 1213–1218. doi:10.1016/j.jvs.2006.08.024
28. Katayama, P.L., Castania, J.A., Dias, D.P.M., Patel, K.P., Fazan, R., Salgado, H.C., 2015. Role of Chemoreceptor Activation in Hemodynamic Responses to Electrical Stimulation of the Carotid Sinus in Conscious Rats. *Hypertension* 66, 598–603. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05316
29. Kennedy, S.H., Giacobbe, P., 2007. Treatment resistant depression--advances in somatic therapies. *Ann. Clin. Psychiatry Off. J. Am. Acad. Clin. Psychiatr.* 19, 279–287. doi:10.1080/10401230701675222
30. Kollai, M., Koizumi, K., 1979. Reciprocal and non-reciprocal action of the vagal and sympathetic nerves innervating the heart. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1, 33–52.
31. Lohmeier, T.E., Barrett, A.M., Irwin, E.D., 2005. Prolonged activation of the baroreflex: a viable approach for the treatment of hypertension? *Curr. Hypertens. Rep.* 7, 193–198.
32. Lohmeier, T.E., Iliescu, R., 2015. The baroreflex as a long-term controller of arterial pressure. *Physiol. Bethesda Md* 30, 148–158. doi:10.1152/physiol.00035.2014
33. Luan, S., Constandinou, T.G., 2014. A charge-metering method for voltage-mode neural stimulation. *J. Neurosci. Methods* 224, 39–47. doi:10.1016/j.jneumeth.2013.11.028
34. Machado, B.H., Castania, J.A., Bonagamba, L.G., Salgado, H.C., 2000. Neurotransmission of autonomic components of aortic baroreceptor afferents in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H67–75.
35. Madershahian, N., Scherner, M., Müller-Ehmsen, J., Halbach, M., Hickethier, T., Velden, R., Choi, Y.-H., Wippermann, J., Wahlers, T., 2014. Baroreflex activation therapy in patients with pre-existing implantable cardioverter-defibrillator: compatible, complementary therapies. *Eur. Eur. Pacing Arrhythm. Card. Electrophysiol. J. Work. Groups Card. Pacing Arrhythm. Card. Cell. Electrophysiol. Eur. Soc. Cardiol.* 16, 861–865. doi:10.1093/europace/eut403
36. Malik, M., 1996. Heart Rate Variability. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 1, 151–181. doi:10.1111/j.1542-474X.1996.tb00275.x

37. Mauskop, A., 2005. Vagus nerve stimulation relieves chronic refractory migraine and cluster headaches. *Cephalgia Int. J. Headache* 25, 82–86. doi:10.1111/j.1468-2982.2005.00611.x
38. McIntyre, C.C., Richardson, A.G., Grill, W.M., 2002. Modeling the excitability of mammalian nerve fibers: influence of afterpotentials on the recovery cycle. *J. Neurophysiol.* 87, 995–1006.
39. Montano, N., Ruscone, T.G., Porta, A., Lombardi, F., Pagani, M., Malliani, A., 1994. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90, 1826–1831.
40. Navaneethan, S.D., Lohmeier, T.E., Bisognano, J.D., 2009. Baroreflex stimulation: A novel treatment option for resistant hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* 3, 69–74. doi:10.1016/j.jash.2008.09.001
41. Neistadt, A., Schwartz, S.I., 1967. Effects of electrical stimulation of the carotid sinus nerve in reversal of experimentally induced hypertension. *Surgery* 61, 923–931.
42. Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2006. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1037–1040. doi:10.1042/BST0341037
43. Pickering, T.G., Davies, J., 1973. Estimation of the conduction time of the baroreceptor-cardiac reflex in man. *Cardiovasc. Res.* 7, 213–219.
44. Popeney, C.A., Aló, K.M., 2003. Peripheral neurostimulation for the treatment of chronic, disabling transformed migraine. *Headache* 43, 369–375.
45. Porta, A., Guzzetti, S., Montano, N., Furlan, R., Pagani, M., Malliani, A., Cerutti, S., 2001. Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 48, 1282–1291. doi:10.1109/10.959324
46. Racz, G.B., Browne, T., Lewis, R., 1988. Peripheral stimulator implant for treatment of causalgia caused by electrical burns. *Tex. Med.* 84, 45–50.
47. Robertson, D., Hollister, A.S., Biaggioni, I., Netteville, J.L., Mosqueda-Garcia, R., Robertson, R.M., 1993. The diagnosis and treatment of baroreflex failure. *N. Engl. J. Med.* 329, 1449–1455. doi:10.1056/NEJM199311113292003
48. Salgado, H.C., Barale, A.R., Castania, J.A., Machado, B.H., Chapleau, M.W., Fazan, R., 2007. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292, H593–600. doi:10.1152/ajpheart.00181.2006
49. Scheffers, I.J.M., Kroon, A.A., Schmidli, J., Jordan, J., Tordoir, J.J.M., Mohaupt, M.G., Luft, F.C., Haller, H., Menne, J., Engeli, S., Ceral, J., Eckert, S., Erglis, A., Narkiewicz, K., Philipp, T., de Leeuw, P.W., 2010. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 1254–1258. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.089
50. Scheffers, I.J.M., Kroon, A.A., Schmidli, J., Jordan, J., Tordoir, J.J.M., Mohaupt, M.G., Luft, F.C., Haller, H., Menne, J., Engeli, S., Ceral, J., Eckert, S., Erglis, A., Narkiewicz, K., Philipp, T., de Leeuw,

- P.W., 2010. Novel baroreflex activation therapy in resistant hypertension: results of a European multi-center feasibility study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 1254–1258. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.089
51. Schmidli, J., Savolainen, H., Eckstein, F., Irwin, E., Peters, T.K., Martin, R., Kieval, R., Cody, R., Carrel, T., 2007. Acute device-based blood pressure reduction: electrical activation of the carotid baroreflex in patients undergoing elective carotid surgery. *Vascular* 15, 63–69.
 52. Shelden, C.H., 1966. Depolarization in the treatment of trigeminal neuralgia. Evaluation of compression and electrical methods; clinical concept of neurophysiological mechanism. *Pain* 373–386.
 53. Slavin, K.V., 2015. *Stimulation of the Peripheral Nervous System: The Neuromodulation Frontier*. Karger Medical and Scientific Publishers.
 54. Strege, D.W., Cooney, W.P., Wood, M.B., Johnson, S.J., Metcalf, B.J., 1994. Chronic peripheral nerve pain treated with direct electrical nerve stimulation. *J. Hand Surg.* 19, 931–939. doi:10.1016/0363-5023(94)90092-2
 55. Tordoir, J.H.M., Scheffers, I., Schmidli, J., Savolainen, H., Liebeskind, U., Hansky, B., Herold, U., Irwin, E., Kroon, A.A., de Leeuw, P., Peters, T.K., Kieval, R., Cody, R., 2007. An implantable carotid sinus baroreflex activating system: surgical technique and short-term outcome from a multi-center feasibility trial for the treatment of resistant hypertension. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* 33, 414–421. doi:10.1016/j.ejvs.2006.11.025
 56. Wustmann, K., Kucera, J.P., Scheffers, I., Mohaupt, M., Kroon, A.A., de Leeuw, P.W., Schmidli, J., Allemann, Y., Delacrétaç, E., 2009. Effects of chronic baroreceptor stimulation on the autonomic cardiovascular regulation in patients with drug-resistant arterial hypertension. *Hypertension* 54, 530–536. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134023
 57. Zannad, F., Stough, W.G., Mahfoud, F., Bakris, G.L., Kjeldsen, S.E., Kieval, R.S., Haller, H., Yared, N., De Ferrari, G.M., Piña, I.L., Stein, K., Azizi, M., 2015. Design considerations for clinical trials of autonomic modulation therapies targeting hypertension and heart failure. *Hypertension* 65, 5–15. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04057

Anexos

Tabela 1 – Valores individuais da resistência elétrica (V) do seio carotídeo de ratos normotensas Wistar, mensurada ao longo de 10 dias.

VOLTAGEM AO LONGO DOS DIAS										
RATO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	5.6	5.1	5.1	7.3	7.2	8.4	7.6	8.0		7.6
2	3.6	2.8	2.5	3.6	3.8	3.8	3.6	3.8		3.8
3	3.9	3.7	3.1	3.9	3.6	3.8	3.8	3.8		3.6
4	3.4	2.5	2.4	2.8	3.0	3.1	3.0	3.1		3.4
5	4.3	4.2	4.2	4.5	3.8	4.9	4.9	4.8		4.9
6	2.8	3.2	2.8	2.8	3.0	3.3	3.5	3.6		
7	6.2	8.2	8.6	7.7	6.7	6.9		6.0	6.8	6.0
8	4.7	4.6	4.5	4.8	4.8		5.4	5.0	5.0	5.0
9	3.7	3.8	3.3	4.8	4.3		4.7	5.0	4.8	5.2
10	4.2	3.6	3.6	4.3	4.2		4.8	4.8	4.8	5.4
11	3.4	4.4		3.8	4.4	3.8	4.2	4.0	4.0	4.0
12	5.3		5.3	5.2	5.2	5.4	4.2			
13	5.7		6.0	6.4	6.2	7.1	7.8	7.6	6.7	8.4
14	4.2		4.5	4.4	4.2	5.2	4.8	4.0	4.1	3.5
Média	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
EPM	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1

Tabela 2 – Valores individuais da resposta hipotensora (mmHg) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais normotensos Wistar, com frequências de 15 a 90 Hz em ratos acordados.

RATO	Hertz			
	15	30	60	90
1	-18	-37	-22	-32
2	-12	-26	-32	-31
3	-20	-28	-20	-46
4	-18	-13	-21	-17
5	-7	-14	-12	-19
6	-31	-35	-36	-23
7	-30	-20	-42	-53
8	-26	-41	-30	-34
9	-34	-24	-28	-11
10	4	-14	-6	-16
Média	-19	-25	-25	-28
EPM	4	3	3	4

Tabela 3 – Valores individuais da resposta bradicárdica (bpm) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais normotensos Wistar, com frequências de 15 a 90 Hz em ratos acordados.

RATO	Hertz			
	15	30	60	90
1	-2	-11	-6	-3
2	-9	-11	-10	-20
3	-19	-38	-61	-59
4	-3	-3	-9	-11
5	-36	-5	-10	-17
6	-91	-82	-134	-48
7	-31	-21	-42	-92
8	-13	-13	-15	-31
9	0	-6	-24	-47
10	1	-35	-18	-107
Média	-20	-23	-33	-44
EPM	9	8	12	11

Tabela 4 – Valores individuais da resposta hipotensora (mmHg) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais SHR, com frequências de 15 a 90 Hz em ratos acordados.

RATO	Hertz			
	15	30	60	90
1	10	0	-52	-54
2	-23	-30	-23	-37
3	9	-15	-37	-46
4	-35	-55	-51	-78
5	-11	-27	-44	-34
6	-9	-19	-27	-35
7	-10	-21	-18	-51
8	-13	-57	-48	-48
9	-14	-24	-37	-61
10	-29	-30	-52	-45
11	-39	-64	-27	-20
12	-21	-38	-64	-55
13	-14	-57	-66	-58
14	-20	-38	-45	-52
Média	-16	-34	-42	-48
EPM	4	5	4	4

Tabela 5 – Valores individuais da resposta bradicárdica (bpm) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais SHR, com frequências de 15 a 90 Hz em ratos acordados.

RATO	Hertz			
	15	30	60	90
1	-66	-97	-218	-190
2	12	34	19	33
3	6	-3	-15	-34
4	-10	-14	-23	-6
5	-15	-25	-27	-34
6	-4	4	-7	-3
7	-24	-34	-38	-37
8	-26	-42	-31	-44
9	-5	-14	-2	-40
10	1	-45	-56	-49
11	-57	-61	-24	-38
12	-15	-26	-79	-48
13	-4	-10	-43	-47
14	-35	-39	-65	-55
Média	-17	-27	-44	-42
EPM	6	8	15	13

Tabela 6 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica do intervalo de pulso de animais wistar antes de 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SDNN	RMSSD	LF (nu)	HF (abs)	LF/HF	0V%	2UV%
1	4.3	5.1	8	8.0	0.09	7	44
2	5.4	6.5	18	11.2	0.12	10	40
3	12.8	7.0	27	13.6	0.32	27	27
4	7.0	4.3	29	3.8	0.41	23	33
5	2.6	3.9	4	2.2	0.04	12	40
Média	6.4	5.4	17.2	7.8	0.20	16	37
EPM	1.6	0.5	4.6	2.0	0.07	4	3

Tabela 7 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica do intervalo de pulso de animais wistar durante 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SDNN	RMSSD	LF (nu)	HF (abs)	LF/HF	0V%	2UV%
1	12.8	8.4	9	16.9	0.11	8	51
2	5.9	7.5	12	11.4	0.12	8	58
3	8.6	7.2	6	13.3	0.07	13	33
4	6.0	4.2	6	3.3	0.09	17	37
5	3.4	3.2	3	2.4	0.03	9	46
Média	7.3	6.1	7.4	9.5	0.08	11	45
EPM	1.5	0.9	1.4	2.6	0.01	2	4

Tabela 8 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) e análise simbólica da pressão arterial sistólica de animais wistar antes de 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SD	LF	OV%
1	5.7	3.2	29
2	6.4	2.5	24
3	5.9	3.8	38
4	8.5	4.1	43
5	7.2	4.4	49
Média	6.7	3.6	36
EPM	0.5	0.3	4

Tabela 9 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) e análise simbólica da pressão arterial sistólica de animais wistar durante 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SD	LF	OV%
1	11.4	0.6	22
2	6.9	0.7	23
3	4.8	0.5	37
4	2.8	1.0	17
5	4.3	0.8	21
Média	6.0	0.7	24
EPM	1.4	0.1	3

Tabela 10 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica do intervalo de pulso de animais SHR antes de 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SDNN	RMSSD	LF (nu)	HF (abs)	LF/HF	0V%	2UV%
1	6.1	5.5					
2	6.8	6.3	14	8.0	0.17	17	36
3	2.2	2.6	23	10.4	0.29	28	29
4	5.0	4.1	11	1.7	0.13	9	43
5	4.7	5.9	25	4.0	0.34	23	34
6	4.4	4.6	13	7.9	0.15	15	40
7	7.4	6.1	14	8.4	0.17	16	29
8	5.6	5.0	37	11.1	0.66	21	32
9	2.3	1.6	15	10.3	0.19	13	25
Média	4.9	4.6	19.0	7.7	0.26	18	33
EPM	0.5	0.5	2.7	1.0	0.05	2	2

Tabela 11 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica do intervalo de pulso de animais SHR durante 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SDNN	RMSSD	LF (nu)	HF (abs)	LF/HF	0V%	2UV%
1	9.6	13.7					
2	7.2	7.0	15.0	45.7	0.18	9	51
3	4.7	4.7	25.5	12.2	0.36	22	33
4	7.2	6.1	28.0	7.7	0.40	18	30
5	6.0	6.9	20.5	9.0	0.27	18	38
6	5.2	5.9	6.5	21.2	0.07	17	33
7	3.9	3.7	16.5	9.3	0.21	17	36
8	3.7	3.2	25	4.2	0.34	17	32
9	3.8	2.7	12	3.9	0.14	11	28
Média	5.7	6.0	18.5	14.1	0.24	16	35
EPM	0.6	1.0	2.2	4.2	0.04	1	2

Tabela 12 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) e análise simbólica da pressão arterial sistólica de animais SHR antes de 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SD	LF	OV%
1	5.6		63
2	11.8	2.1	62
3	4.5	2.2	14
4	9.8	0.9	37
5	7.0	16.8	23
6	8.2	13.7	36
7	7.5	7.9	39
8	7.3	4.7	8
9	3.7	6.2	8
Média	7.3	6.8	32
EPM	0.8	1.7	6

Tabela 13 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) e análise simbólica da pressão arterial sistólica de animais SHR durante 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SD	LF	OV%
1	6.1		47
2	8.0	1.3	52
3	6.6	2.1	11
4	9.5	5.3	25
5	7.7	5.3	34
6	6.6	6.1	31
7	5.1	2.0	11
8	8.0	1.4	7
9	5.0	5.4	25
Média	7.0	3.6	27
EPM	0.4	0.6	5

Tabela 14 – Valores individuais da resposta sobre a pressão arterial média (mmHg) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais SHR, ao longo de 48 horas de estimulação.

RATO	Basal	24h	48h / off
1	157	138	121
2	162	122	159
3	191	145	166
4	191	165	170
5	168	126	137
6	173	157	143
7	191	137	161
8	150	127	139
9	173	140	150
10	5	5	5
Média	157	138	121
EPM	162	122	159

Tabela 15 – Valores individuais da resposta sobre frequência cardíaca (bpm) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais SHR, ao longo de 48 horas de estimulação.

RATO	Basal	24h	48h / off
1	338	308	322
2	345	242	390
3	339	349	381
4	386	408	344
5	449	282	296
6	479	369	428
7	374	305	345
8	366	331	373
9	385	324	360
10	16	16	13
Média	338	308	322
EPM	345	242	390

Tabela 16 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica em porcentagem de variação (0V, 1V, 2LV e 2UV) do intervalo de pulso de animais SHR antes da estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF	0V	1V	2LV	2UV
1	4.7	2.3						26	51	5	17
2	4.9	2.1	1.19	2.49	32.0	68.0		32	48	5	15
3	4.0	2.7	2.43	5.69	31.0	69.0	0.52	10	54	13	23
4	3.3	1.9	0.99	1.51	38.0	62.0	0.66	21	49	9	21
5	4.9	2.0	0.82	2.65	23.0	77.0	0.32	38	42	2	17
6	3.6	3.9	0.77	1.16	37.0	63.0	0.73	9	27	2	62
7	5.9	4.1	1.16	2.00	38.0	62.0	0.68	17	47	7	29
8	6.0	3.0	0.58	1.81	25.0	75.0	0.41	30	35	2	33
9	5.6	1.6	0.84	2.90	22.0	78.0	0.31	40	42	3	15
Média	4.8	2.6	1.1	2.5	30.8	69.3	0.5	25	44	6	26
EPM	0.3	0.3	0.2	0.5	2.5	2.5	0.1	3.8	2.8	1.2	5.0

Tabela 17 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica em porcentagem de variação (0V, 1V, 2LV e 2UV) do intervalo de pulso de animais SHR após a estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF	0V	1V	2LV	2UV
1	5.0	1.9	0.38	1.52	19.00	81.00	0.24	36	46	2	16
2	7.0	3.0	1.14	1.79	36.00	64.00	0.62	14	49	9	28
3	1.9	1.5	0.75	1.59	30.00	70.00	0.47	16	39	9	36
4	3.2	2.0	0.68	3.18	17.00	83.00	0.23	21	48	9	22
5	6.1	2.7	0.04	0.39	10.00	90.00	0.12	30	45	4	21
6	4.1	3.6	1.21	2.06	34.00	66.00	0.59	19	47	6	28
7	3.5	2.7	1.86	4.15	29.00	71.00	0.44	15	47	8	29
8	6.1	3.4	1.53	2.80	28.00	72.00	0.50	22	44	5	29
9	6.0	2.3	2.18	3.57	33.00	67.00	0.60	32	45	3	20
Média	4.8	2.6	1.1	2.3	26	74	0.4	23	46	6	26
EPM	0.6	0.2	0.2	0.4	3.0	3.0	0.1	2.6	0.9	0.8	2.0

Tabela 18 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) da pressão arterial sistólica de animais SHR antes da estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SD	LF
1	8.5	
2	6.9	4.88
3	7.0	4.74
4	9.2	4.80
5	8.8	16.35
6	4.2	11.92
7	6.3	10.42
8	8.6	9.52
9	7.9	0.88
Média	7.5	7.9
EPM	0.5	1.9

Tabela 19 - Valores individuais do SD (mmHg) e LF (mmHg) da potência da banda de baixa (LF) da pressão arterial sistólica de animais SHR após a estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SD	LF
1	8.0	
2	6.8	6.81
3	7.0	12.00
4	6.9	10.86
5	8.9	4.57
6	4.6	3.20
7	6.6	23.37
8	9.0	0.85
9	7.4	1.06
Média	7.3	7.8
EPM	0.4	2.8

Tabela 20 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso de animais hipertensos L-NAME antes da estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	2.4	1.0	0.3	0.5	36	25
2	10.0	4.4	0.3	3.5	34	34
3	2.3	1.5	0.2	0.6	19	40
4	6.1	4.2	0.8	4.1	23	37
5	2.9	3.2	0.3	2.0	19	33
6	3.7	2.6	0.4	2.2	22	32
7	4.9	3.2	1.0	3.1	20	34
8	3.4	2.1	0.4	1.2	24	35
9	5.0	3.3	0.4	2.1	22	32
Média	4.5	2.8	0.4	2.1	24.3	33.6
EPM	0.8	0.4	0.1	0.4	2.0	1.3

Tabela 21 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso de animais hipertensos L-NAME após a estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	2.7	2.1	0.1	1.5	17	50
2	8.1	5.7	1.0	7.9	10	31
3	1.4	0.9	0.1	0.3	13	42
4	8.0	4.7	1.1	6.1	19	43
5	4.4	3.4	0.2	3.4	12	42
6	4.4	3.2	0.3	2.1	14	43
7	6.1	4.1	1.0	4.9	15	45
8	4.1	3.6	0.2	2.5	15	32
9	6.0	3.9	0.4	3.2	27	40
Média	5.0	3.5	0.5	3.5	15.9	40.9
EPM	0.7	0.5	0.1	0.8	1.5	1.9

Tabela 22 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso do grupo controle de animais hipertensos L-NAME antes do período que corresponderia à estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	5.9	3.3	0.8	2.3	31	36
2	5.7	3.8	0.7	3.4	21	23
3	6.3	2.7	1.1	2.4	29	20
4	5.2	2.3	0.3	1.3	35	41
5	4.6	3.7	0.9	3.9	20	36
6	2.9	2.9	0.3	1.9	17	39
7	4.9	3.1	0.4	1.8	22	32
Média	5.1	3.1	0.6	2.4	25.0	32.3
EPM	0.4	0.2	0.1	0.3	2.4	2.7

Tabela 23 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso do grupo controle de animais hipertensos L-NAME após o período que corresponderia à estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	6.2	4.3	0.8	5.5	14	36
2	10.1	6.1	2.7	7.8	19	40
3	8.0	5.4	1.1	8.0	17	26
4	8.2	3.5	0.7	2.7	33	51
5	4.8	4.2	0.4	4.4	12	37
6	11.1	6.3	1.6	10.0	19	43
7	5.0	2.8	0.3	1.7	18	39
Média	7.6	4.7	1.1	5.7	18.9	38.9
EPM	0.9	0.5	0.3	1.1	2.3	2.7

Tabela 24 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso do grupo sham de animais hipertensos L-NAME antes do período que corresponderia à estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	5.0	4.3	0.34	4.62	12	51
2	7.5	7.6	1.15	3.8	19	44
3	5.2	4.9	0.57	6.26	16	63
4	9.2	10.4	2.52	6.7	11	37
5	7.7	5.1	1.87	6.65	20	42
6	4.6	2.8	0.41	1.96	17	47
Média	6.5	5.8	1.1	5.0	16.0	47.1
EPM	0.8	1.1	0.4	0.8	1.5	3.6

Tabela 25 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²) e análise simbólica em porcentagem de variação (0V e 2V) do intervalo de pulso do grupo sham de animais hipertensos L-NAME após o período que corresponderia à estimulação elétrica do seio carotídeo (48h).

RATO	SDNN	RMSSD	LF (abs)	HF (abs)	0V	2V
1	4.7	2.3	0.81	1.57	24	48
2	5.1	4.1	0.36	4.56	12	55
3	3.6	4.0	0.37	2.6	11	49
4	6.5	4.6	1.09	4.14	16	32
5	6.3	3.1	0.93	2.15	26	52
6	6.8	5.8	0.55	8.36	9	44
Média	5.5	4.0	0.7	3.9	16.4	46.6
EPM	0.5	0.5	0.1	1.0	3.0	3.2

Tabela 26 – Valores individuais da resposta sobre a pressão arterial média (mmHg) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	186.6	160.0
2	181.8	144.2
3	180.2	179.3
4	162.9	173.1
5	165.9	173.2
6	165.8	137.6
7	168.6	173.2
8	208.9	170.1
9	173.6	133.0
10	182.6	170.7
11	186.6	161.4
Média	177.7	5.3
EPM	4.3	160.0

Tabela 27 – Valores individuais da resposta sobre a frequência cardíaca (bpm) produzida pela estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	460	454
2	395	388
3	483	498
4	406	428
5	401	350
6	395	411
7	493	435
8	408	353
9	325	391
10	447	445
11	363	390
Média	433	414
EPM	14	16

Tabela 28 – Valores individuais da resposta sobre a pressão arterial média (mmHg) do grupo controle da estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, do período que corresponderia à antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	185.0	159.0
2	149.0	175.8
3	166.4	181.8
4	156.6	135.7
5	165.0	176.9
6	134.1	150.3
7	162.8	154.6
Média	168.1	151.4
EPM	160.9	160.7

Tabela 29 – Valores individuais da resposta sobre a frequência cardíaca (bpm) do grupo controle da estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, do período que corresponderia à antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	412	377
2	362	362
3	361	385
4	361	338
5	362	376
6	382	299
7	425	441
Média	380	368
EPM	10	16

Tabela 30 – Valores individuais da resposta sobre a pressão arterial média (mmHg) do grupo sham da estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, do período que corresponderia à antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	181.5	179.2
2	159.5	177.3
3	153.0	136.3
4	166.3	175.0
5	167.4	160.6
6	147.8	133.5
Média	162.6	160.3
EPM	4.9	8.5

Tabela 31 – Valores individuais da resposta sobre a frequência cardíaca (bpm) do grupo sham da estimulação elétrica do seio carotídeo em animais hipertensos L-NAME, do período que corresponderia à antes e após 48 horas de estimulação.

RATO	Antes	Após
1	343	479
2	346	465
3	341	446
4	314	430
5	344	415
6	366	372
Média	342	434.6
EPM	6	15.7

Tabela 32 - Valores individuais do SDNN, RMSSD, das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF) em unidades absolutas (ABS – ms²), potência relativa (%) dos espectros em cada banda de frequência e a razão LF/HF e análise simbólica do intervalo de pulso de animais wistar antes de 60 min de estimulação elétrica contínua do seio carotídeo.

RATO	SDNN	RMSSD	LF (nu)	HF (abs)	LF/HF	0V%	2UV%
1	4.3	5.1	8	8.0	0.09	7	44
2	5.4	6.5	18	11.2	0.12	10	40
3	12.8	7.0	27	13.6	0.32	27	27
4	7.0	4.3	29	3.8	0.41	23	33
5	2.6	3.9	4	2.2	0.04	12	40
Média	6.4	5.4	17.2	7.8	0.20	16	37
EPM	1.6	0.5	4.6	2.0	0.07	4	3