KARIN FLUES

Influência da integridade dos barorreceptores nos ajustes morfofuncionais cardíacos à hipertensão espontânea em ratos

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra Elia Garcia Caldini

São Paulo

2011

KARIN FLUES

Influência da integridade dos barorreceptores nos ajustes morfofuncionais cardíacos à hipertensão espontânea em ratos

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra Elia Garcia Caldini

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Flues, Karin

Influência da integridade dos barorreceptores nos ajustes morfofuncionais cardíacos
à hipertensão espontânea em ratos / Karin Flues.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Garcia Caldine.

Descritores: 1.Barorreflexo 2.Sistema nervoso autônomo 3.Hipertensão
4.Remodelação cardíaca ventricular 5.Arteria pulmonar 6.Hipertensão pulmonar
7.Ratos Wistar 8.Ratos espontaneamente hipertensivos

USP/FM/DBD-191/11

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao nosso pai maior – Deus – pela minha vida, pela saúde, pelas oportunidades, e pela convivência com pessoas maravilhosas! Sei que tudo que eu disser ou fizer é pouco para agradecer. Nesta caminhada senti a sua presença, sustentando-me e ensinando-me a prosseguir. Neste momento tão importante, mais uma vez ensinando-me a enxergar além do horizonte. Obrigada por tudo, meu Deus!

A minha família pela minha formação moral e intelectual, a vocês meu reconhecimento e a minha eterna gratidão!

A minha querida Profa Maria Cláudia Irigoyen, pelo empenho na minha formação, pela sua dedicação na orientação deste estudo, pelo seu saber, pelo seu exemplo extraordinário de determinação e liderança, além do grande apoio, amizade e carinho;

A minha querida Profa Katia De Angelis, por ter me incentivado a iniciar a carreira acadêmica/científica, pela sua competência, dedicação, apoio e amizade;

A minha orientadora, Profa Elia Garcia Caldine, agradeço pelo carinho, pelo amparo e pelo exemplo de competência e sabedoria;

A professora Silvia Lacchini, pela sua dedicação e disponibilidade nas discussões;

Às minhas amigas queridas, Christiane, Mariana, Pamella e Ivana, pelos momentos de descontração, pelo importante apoio, amizade e estímulo recebido;

Ao Edson pelo carinho, apoio e dedicação;

Ao meu colega Cristiano, pelo apoio, pela discussão, e pela dedicação de horas de seu tempo para ajudar e me ouvir... Você é um anjo que Deus colocou em meu caminho!

A todos os membros do laboratório de hipertensão experimental do Instituto do Coração, que de uma forma ou de outra, contribuíram com sua companhia, com suas discussões e com sugestões efetivas para a realização deste estudo, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

A todos do laboratório de biologia celular e anatomia funcional, Instituto Ciências Biomédicas, em especial à professora Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves e a sua aluna Gabriela Placoná Diniz, pela colaboração, auxílio e apoio;

A todos do laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial a Cristina Viveiros Cordeiro da Fonseca, Valéria Veiga Sales, Mariana Matera Veras, pela colaboração, auxílio e apoio;

Ao programa de pós graduação de fisiopatologia experimental;

À Fapesp pelo apoio financeiro.

' A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda a arte e de toda ciência verdadeira'. Albert Einsten

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas e siglas	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Pressão arterial e sua regulação.....	1
1.2	Barorreceptores arteriais e desnervação sinoaórtica.....	3
1.3	Desnervação sinoaórtica, variabilidade da pressão arterial e hipertrofia cardíaca.....	5
1.4	Hipertensão espontânea.....	7
1.5	Marcadores de hipertrofia cardíaca.....	9
1.6	Hipertensão pulmonar.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivos específicos.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Grupos experimentais.....	15
3.2	Delineamento do protocolo experimental.....	15
3.3	Desnervação sinoaórtica.....	16
3.4	Avaliação ecocardiográfica.....	18
3.5	Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	21
3.5.1	Canulação.....	21
3.5.2	Registro de pressão arterial.....	23
3.5.3	Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores.....	24
3.6	Análise espectral (transformada rápida de Fourier FFT).....	25
3.7	Avaliações da função ventricular pela cateterização do ventrículo esquerdo e direito.....	26
3.8	Eutanásia.....	27
3.9	Avaliação da hipertrofia ventricular.....	28
3.9.1	Diâmetro de cardiomiócitos.....	28
3.9.2	Quantificação de colágeno.....	29
3.9.3	Extração do rna total e cdna.....	30
3.10	Avaliação do remodelamento das arteríolas pulmonares.....	32

3.10.1	Avaliação morfométrica.....	34
3.10.2	Quantificação de colágeno.....	34
3.11	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS.....	36
4.1	Peso corporal.....	36
4.2	Avaliação ecocardiográfica.....	37
4.3	Avaliações hemodinâmicas.....	45
4.4	Sensibilidade barorreflexa.....	48
4.5	Variabilidade da frequência cardíaca expressa pelo intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo (variância) e da frequência (análise espectral, transformada rápida de fourier-FFT).....	50
4.6	Avaliações invasivas da função ventricular.....	54
4.7	Avaliação da hipertrofia ventricular.....	56
4.8	Diâmetro de cardiomiócitos.....	58
4.9	Quantificação de colágeno.....	59
4.10	PCR em tempo real.....	62
4.11	Avaliação do remodelamento das artérias pulmonares.....	65
4.12	Correlações.....	68
5	DISCUSSÃO.....	71
5.1	A Influência do barorreflexo nas avaliações hemodinâmicas e autonômicas...	72
5.2	A Influência do barorreflexo em variáveis funcionais e estruturais cardiovasculares.....	75
5.3	A Influência do barorreflexo na hipertensão pulmonar e no remodelamento das artéria pulmonares.....	82
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	85
7	REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF: Alta Frequência

ANP: Peptídeo Natriurético Atrial

ANOVA: Análise de Variância

ATRAMI: Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction (Tônus Autônomo e Reflexos após Infarto do Miocárdio)

BF: Baixa Frequência

BR: Bronquíolo Respiratório

RNA: Ácido Ribonucleico

RNA_m: Ácido Ribonucleico mensageiro

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Desvio Padrão

DPPAD: Desvio Padrão da Pressão Arterial Diastólica

DPPAM: Desvio Padrão da Pressão Arterial Média

DPPAS: Desvio Padrão da Pressão Sistólica

DPVFC: Desvio Padrão da Variabilidade da Frequência Cardíaca

+dP/dt: Derivada de Contração

-dP/dt: Derivada de Relaxamento

DSA: Desnervação Sinoaórtica

ECA: Enzima conversora da angiotensina

EPM: Erro Padrão da Média

ERP: Espessura Relativa da Parede

FC: Frequência Cardíaca

FE_j: Fração de Ejeção

FFT: *Fast Fourier Transform* (Transformada Rápida de Fourier)

GN: Grupo normotenso

GND: Grupo normotenso Desnervado

GH: Grupo Hipertenso

GHD: Grupo Hipertenso Desnervado

GMP: Guanosina Monofosfato

HAP: Hipertensão Arterial Pulmonar

HE: Hematoxilina-Eosina

HF: *High Frequency* (alta frequência)

HVD: Hipertrofia do ventrículo direito

HVE: Hipertrofia do ventrículo esquerdo

IBR: Índice de Bradicardia Reflexa

IDM: Índice de Desempenho Miocárdico

IP: Intervalo de Pulso

ITR: índice de Taquicardia Reflexa

K: Coerência

KCI: Cloreto de Potássio

LF: *Low Frequency* (baixa frequência)

MBF: Muito Baixa Frequência

Modo M: Modo Monodimensional

MVE: Massa Ventricular Esquerda

NaOH: Hidróxido de Sódio

OH-Pro: Hidroxiprolina

PA: Pressão Arterial

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAM: Pressão Arterial Média

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PC: Peso Corporal

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PDF: Pressão Diastólica Final

PMAP: Pressão Média da Artéria Pulmonar

PPDIA: Parede Posterior do Ventrículo na Diástole

SDNN: Média dos Desvios Padrão

SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats* (Ratos Espontaneamente Hipertensos)

SRA: Sistema Renina Angiotensina

SVDIA: Espessura Diastólica Do Septo Interventricular

TAAP: Tempo de Aceleração da Artéria Pulmonar

TE: Tempo de Ejeção

VARIP: Variância do Intervalo de Pulso

VARPAS: Variância da Pressão Arterial Sistólica

VEDIA: cavidade do ventrículo esquerdo ao final da diástole

TRIV: Tempo de Relaxamento Isovolumétrico

VD: Ventrículo Direito

VE: Ventrículo Esquerdo

VDDIA: Ventrículo Direito na Diástole

VDSIST: Ventrículo Direito na Sístole

VEDIA: Ventrículo Esquerdo na Diástole

VEC: Velocidade de Encurtamento Circunferencial

VESIS: Ventrículo Esquerdo na Sístole

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VPAD: Variância da Pressão Arterial Diastólica

VPAM: Variância da Pressão Arterial Média

VPAS: Variância da Pressão Arterial Sistólica

FVC: Fração De Volume de Colágeno

β -MCP: Beta Miosina de Cadeia Pesada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	A) Visão ventral do animal com incisão expondo a musculatura do pescoço; B) Visão do feixe vâscuo-nervoso após afastamento da musculatura do pescoço. (Desenho S. Lacchini).....	17
Figura 2-	Inervação do corpo carotídeo e dos pressorreceptores carotídeos da bifurcação da carótida. (Desenho S. Lacchini).....	18
Figura 3-	Esquematização do procedimento da canulação. A) Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral. B) Isolamento da artéria femoral e inserção da cânula.....	22
Figura 4-	Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).....	24
Figura 5-	Esquema representativo de ácino pulmonar, com presença de bronquíolo respiratório terminal, bronquíolo respiratório (BR), ducto alveolar, sacos alveolares, alvéolos e artérias pulmonares. As porções intra-acinares são o BR e os ductos alveolares. (Junqueira adaptado).....	33
Figura 6-	Tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (VEDIACorr), septo interventricular na diástole (SIVDIACorr) e parede posterior do ventrículo (PPDIACorr) corrigidos pelo peso corporal dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	39
Figura 7-	Massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal (MVEcorr peso) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	40
Figura 8-	Débito cardíaco (DC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	42
Figura 9-	Índice de desempenho miocárdico (IDM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN.....	43
Figura 10-	Tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	44
Figura 11-	Pressão média da artéria pulmonar (PMAP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs.	

	GH.....	44
Figura 12-	Pressão arterial média (PAM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * p <0,05 vs .GN; † p <0,05 vs. GND.....	46
Figura 13-	Variabilidade da pressão arterial média expressa pela média dos desvios padrão (DP PAM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	48
Figura 14-	Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas às variações de PA dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	49
Figura 15-	Balanco Autonômico (LF/HF) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * p <0,05 vs GN; † p <0,05 vs GND.....	52
Figura 16-	Índice alfa dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	54
Figura 17-	Pressão diastólica final (PDF) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs GN; † p <0,05 vs GND; # p <0,05 vs GH.....	56
Figura 18-	Peso do coração/peso corporal (coração/peso corporal) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs GN; † p <0,05 vs GND; # p <0,05 vs GH.....	58
Figura 19-	Diâmetro Cardiomiócitos dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs GN; † p <0,05 vs GND; # p <0,05 vs GH.....	59
Figura 20-	Percentual de colágeno no VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs GN; † p <0,05 vs. G.....	60
Figura 21-	Imagens representativas de lâminas coradas com <i>picrosirious red</i> no VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	60
Figura 22-	Percentual de colágeno no VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH. ND; # p <0,05 vs. GH.....	61

Figura 23-	Imagens representativas de lâminas coradas com <i>picrosirious red</i> no VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	61
Figura 24-	Percentual de concentração de hidroxiprolina (OH-Pro) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	62
Figura 25-	Expressão gênica do colágeno tipo I no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	64
Figura 26-	Expressão gênica do colágeno tipo III no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.....	64
Figura 27-	Percentual de colágeno da artéria pulmonar da região intra acinar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH), e hipertenso desnervado (GHD).....	66
Figura 28-	Fotomicrografia de colágeno das artérias pulmonares da região pré acinar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	66
Figura 29-	Fotomicrografia de colágeno das artérias pulmonares da região intra acinar mostrando infiltrado inflamatório na adventícia e na parede dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	67
Figura 30	Fotomicrografia das artérias pulmonares da região intra acinar mostrando infiltrado inflamatório na adventícia e na parede dos grupos normotenso (GND), e do grupo hipertenso desnervado (GHD).....	67
Figura 31-	Correlação entre a massa do ventriculo esquerdo sobre o peso corporal do rato (VE/PC) com a modulação autonômica (LF/HF) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	68
Figura 32-	Correlação entre a pressão diastólica final do VD (PDF) com o tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	69
Figura 33-	Correlação entre a derivada de relaxamento do VD (-dP/dt) com o índice de velocidade de relaxamento rápido ventricular do tecido do	

VD (E' VD) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	70
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Desenho das seqüências dos “primers” utilizados.....	32
Tabela 2-	Peso corporal dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD) na primeira (inicial) e na décima semana (final).....	36
Tabela 3-	Variáveis ecocardiográficas de morfometria cardíaca dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	38
Tabela 4-	Variáveis ecocardiográficas de função diastólica dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	41
Tabela 5-	Variáveis ecocardiográficas de função sistólica dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	42
Tabela 6-	Pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	45
Tabela 7-	Variabilidade da pressão arterial foi expressa pela média dos desvios padrão (DP), desvio padrão da pressão diastólica (DPPAD), desvio padrão da pressão arterial sistólica (DPPAS), desvio padrão da pressão arterial média (DPPAM) e desvio padrão da frequência cardíaca (DPVFC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD) expressa pela média dos desvios padrões.....	47
Tabela 8-	Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas à variações de pressão arterial dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	49
Tabela 9-	Variabilidade do intervalo de pulso (IP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	51
Tabela 10-	Variabilidade da pressão arterial sistólica (VARPAS) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	53
Tabela 11-	Derivadas de contração (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt) do VE e do VD, e PAS do VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD)...	55

Tabela 12-	Parâmetros de hipertrofia ventricular esquerda e direita dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	57
Tabela 13-	Expressão gênica de ANF do VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	63
Tabela 14-	Razão entre a área interna do lúmen sobre a área da parede da artéria pulmonar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).....	65

RESUMO

Flues K. *Influência da integridade dos barorreceptores nos ajustes morfofuncionais cardíacos à hipertensão espontânea em ratos*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Tem sido demonstrado que a redução da sensibilidade do barorreflexo é um marcador independente de risco de mortalidade. O barorreflexo arterial tem um papel importante na manutenção e na estabilidade da pressão arterial (PA) momento a momento. Embora a variabilidade da pressão arterial (VPA) seja conhecida como contribuinte para a morbidade e mortalidade, os mecanismos pelos quais a VPA causa lesões de órgãos alvo ainda não estão bem entendidos. No presente estudo, testamos a hipótese de que o prejuízo do barorreflexo, com ou sem o aumento da PA, pode induzir o remodelamento cardíaco e da artéria pulmonar por alterar a modulação autonômica comandada pelos barorreceptores arteriais sobre coração e vasos. Para tanto, foi investigado em ratos normotensos e hipertensos o efeito da disfunção barorreflexa (10 semanas após desnervação sinoaórtica- DSA) nas alterações hemodinâmicas, no remodelamento cardíaco e no remodelamento da artéria pulmonar. A função e a morfologia cardíaca de ratos machos Wistar e SHR (GN e GH) foram avaliadas pelo ecocardiograma e por histologia. A pressão arterial foi gravada diretamente. A hipertrofia ventricular foi expressa pela relação entre peso do ventrículo esquerdo (VE) e peso do ventrículo direito (VD) pelo peso corporal do rato (PC). A VPA foi avaliada pelo domínio do tempo e da frequência. A expressão gênica pela quantificação do mRNA do peptídeo natriurético (ANP), da alfa-actina esquelética (α -actina), do colágeno tipo I e tipo III foi avaliada pelo RT-PCR. A PA estava maior no grupo SHR quando comparada ao normotenso, mas a DSA não alterou os valores de PA nos grupos normotenso e hipertenso. A VPA sistólica mostrou-se maior nos grupos com DSA. Como esperado, a resposta barorreflexa estava reduzida nos grupos com DSA. Os componentes LF e HF da VFC estavam maiores nos grupos GH e GHD. Entretanto, o componente HF da VFC estava menor em GHD quando comparado ao GH. O tempo de aceleração da artéria pulmonar estava reduzido nos grupos com DSA. Adicionalmente, a DSA prejudicou a função diastólica no VE: (GN: $5,8 \pm 0,19$ vs GD: $8,0 \pm 0,29$ e GH: $8,2 \pm 0,54$ vs GHD: $13,5 \pm 0,84$ mmHg) e no VD (GN: $3,5 \pm 0,15$ vs WD: $4,85 \pm 0,15$ e HC: $5,83 \pm 0,31$ vs HD: $7,77 \pm 0,25$ mmHg). A DSA induziu hipertrofia ventricular direita e esquerda de acordo com o índice de VE e VD/ PC (9% no GD e 10% no GHD) e (25% no GD e 34% no GHD) respectivamente, bem como a DSA induziu aumento de colágeno no VE (de 1,6-vezes no GD e 2-vezes no GHD), no VD (2,9-vezes no GD e 1,15-vezes no GHD), e na artéria pulmonar (3,38-vezes no GD e 1,53-vezes no GHD). Além disso, a DSA aumentou a expressão de colágeno tipo I no VE (6,7-vezes no GD e 1,6-vezes no GHD) e VD (5,7-vezes no GD e 5,3-vezes no GHD); de colágeno tipo III no VE (3-vezes no GD e 2-vezes no GHD) e VD (4,6-vezes no GD e 2,4-vezes no HD). A desnervação aumentou, nos ratos normotensos, a expressão de ANP no VE (1,8-vezes) e no VD (1,8-vezes), de α -actina no VE (3,7-vezes) e VD (1,2-vezes). Entretanto, apenas o grupo GHD aumentou a expressão de α -actina no VD (1,9-vezes). Nossos resultados demonstraram que o prejuízo da função barorreflexa ocasionado pela DSA, sem modificações na PA, induziu importantes ajustes na estrutura cardíaca caracterizados pela hipertrofia do VE e do VD, bem como na indução da hipertensão pulmonar. Estas mudanças podem sugerir que a disfunção barorreflexa isolada pode modular lesões de tecidos alvo.

Descritores: Barorreflexo, Sistema nervoso autônomo, hipertensão arterial, remodelação cardíaca ventricular, artéria pulmonar, hipertensão pulmonar, ratos Wistar, ratos espontaneamente hipertensivos.

ABSTRACT

Flues K. *Influence of baroreceptor integrity on cardiac morpho-functional adjustments to spontaneous hypertension in rats*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

It has been demonstrated that reduced baroreflex sensitivity is an independent marker of mortality risk. The arterial baroreflex plays an important role in the maintenance of the moment-to-moment stability of blood pressure (BP). Although the contribution of blood pressure variability (BPV) to cardiovascular morbidity and mortality is well established, the mechanisms by which BPV causes end-organ damage process are still unknown. In the present study, we hypothesized that baroreflex impairment, with or without increase in BP, can induce cardiac and pulmonary artery remodeling by altering the autonomic modulation controlled by the arterial baroreceptors to the heart and vessels. For these purposes, it were investigated in normotensive and hypertensive rats the effects of baroreceptors dysfunction (10 weeks after sinoaortic denervation - SAD) on hemodynamic alterations and on cardiac and pulmonary arterial remodeling. Cardiac function and morphology of male normotensive Wistar (GN) and spontaneously hypertensive (GH) intact rats which underwent SAD (GD and GHD, respectively) were assessed by echocardiography and histology. BP was directly recorded. Ventricular hypertrophy was quantified by the ratio of left ventricular weight (LVW) and right ventricular weight (RVW) to body weight (BW). BPV was quantified in the time and frequency domains. The natriuretic peptide (ANP), alpha-skeletal actin (α -skeletal), collagen type I and type III genes mRNA expressions were evaluated by RT-PCR. SHR presented higher BP than Wistar rats, but SAD did not change BP values either in normotensive or in hypertensive groups. Systolic BPV was increased in both SAD groups. As expected, baroreflex responses were reduced in both SAD groups. LF and HF components of HRV were increased in GH and GHD groups. However, HF component of HRV was increased in GHD as compared to GH. The pulmonary artery acceleration time was reduced in both SAD groups. In addition, SAD impaired diastolic function in both LV (GN: 5.8 ± 0.19 vs GD: 8.0 ± 0.29 and GH: 8.2 ± 0.54 vs GHD: 13.5 ± 0.84 , mmHg) and RV (GN: 3.5 ± 0.15 vs GD: 4.85 ± 0.15 and GH: 5.83 ± 0.31 vs GHD: 7.77 ± 0.25 , mmHg). SAD induced LV and RV hypertrophy according to LVW and RVW/BW indexes (LV: 9% in GD and 10% in GHD and RV: 25% in GD and 34% in GHD), as well as, SAD induced an augment in total collagen in LV (of 1.6-fold in GD and 2-fold in GHD), in RV (2.9-fold in GD and 1.15-fold in GHD), and in pulmonary artery (3.38-fold in GD and 1.53-fold in GHD). Also, SAD increased collagen gene expression type I in LV (6.7-fold in GD and 1.6-fold in GHD) and RV (5.7-fold in GD and 5.3-fold in GHD); collagen type III in LV (3-fold in GD and 2.1-fold in GHD) and RV (4.6-fold in GD and 2.4-fold in GHD). In normotensive rats, SAD increased ANP expression in LV (1.8-fold) and in RV (1.8-fold), and α -skeletal in LV (3.7-fold) and RV (1.2-fold). However, GHD group only enhanced α -skeletal expression in RV (1.9-fold). Our results showed that the impairment of baroreflex function by SAD, despite not changing BP, induced important adjustments of cardiac structure characterizing LV and RV hypertrophy, as well as induced pulmonary hypertension. These changes may indicate that isolated baroreflex dysfunction can modulate target-tissue damage.

Descriptors: baroreflex, autonomic nervous system, hypertension, ventricular cardiac remodeling, pulmonary artery, pulmonary hypertension, Wistar rats, spontaneously hypertensive rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pressão arterial e sua regulação

A perfusão tecidual adequada é garantida pela manutenção da força motriz da circulação - a pressão sanguínea - em níveis adequados e razoavelmente constantes, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades. A pressão arterial (PA), portanto, depende de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco = frequência cardíaca x volume sistólico), a resistência periférica e a capacitância venosa, que condiciona a pré-carga e, portanto, o volume sistólico. Cada um destes determinantes primários da PA é por sua vez determinado por uma série de fatores (Michellini, 1999; Kaplan, 1998).

Na hipertensão estabelecida, existem alterações em praticamente todos esses controladores, sendo difícil estabelecer quais os que tiveram papel preponderante no desencadeamento e mesmo na manutenção de valores elevados de PA. Embora seja improvável que todos esses fatores estejam alterados ao mesmo tempo num dado paciente, arranjos múltiplos podem ser encontrados, uma vez que o marcador hemodinâmico da hipertensão primária é o aumento persistente da resistência vascular periférica, o qual pode ser determinado através de diferentes associações desses fatores determinantes.

A variação do tônus vascular depende de diferentes fatores funcionais. Dentre eles, destaca-se a atividade simpática gerada centralmente e modulada por aferências de diferentes reflexos e por substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes ou produzidas pelas células da musculatura lisa ou endoteliais. Um considerável número de

evidências dá suporte ao aumento da atividade simpática precocemente na hipertensão (Dequattro e Feng, 2002; Irigoyen et al., 2001).

Sabe-se que embora muitos reflexos estejam envolvidos na modulação da atividade simpática, os barorreceptores arteriais (alta pressão) são considerados o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento. Na hipertensão sustentada, esses mecanorreceptores sofrem adaptação, deslocando sua faixa de funcionamento para um novo nível de PA, que normalmente é acompanhada de redução da sensibilidade dos pressorreceptores (Krieger et al., 1982). Isso determina que, para uma variação igual da PA, os hipertensos tenham uma menor quantidade de informações e conseqüentemente uma deficiência na regulação reflexa da PA. A menor sensibilidade dos barorreceptores é provavelmente o maior determinante do aumento da variabilidade da PA (Irigoyen e Krieger, 1998; Floras et al., 1988) em indivíduos hipertensos, e de forma indireta associada às conseqüentes lesões dos órgãos-alvo (Floras et al., 1988).

A disfunção barorreflexa tem sido demonstrada em várias doenças cardiovasculares (La Rovere et al., 1998) e na hipertensão clínica e experimental (Irigoyen & Krieger, 1988; Mancia et al., 1997). Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que jovens normotensos, filhos de hipertensos, apresentam aumento da PA, dos níveis séricos de catecolaminas e redução da resposta barorreflexa da frequência cardíaca, quando comparados a jovens filhos de normotensos (Lopes et al., 1997). Esses dados apontam para o envolvimento precoce do sistema nervoso autônomo na gênese da hipertensão arterial bem como indicam que a predisposição genética para a hipertensão pode cursar com a redução da sensibilidade desse importante mecanismo de controle reflexo momento a momento.

O controle reflexo da circulação comandado pelos barorreceptores tem sido reconhecido também como um importante preditor de risco após evento cardiovascular.

De fato, o estudo ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) forneceu evidências clínicas do valor prognóstico da sensibilidade do barorreflexo e da variabilidade da frequência cardíaca na mortalidade cardíaca pós infarto do miocárdio, independente da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e de arritmias ventriculares (La Rovere et al., 1998).

Não se conhece, entretanto, se essas alterações de sensibilidade do barorreflexo que estão relacionadas ao risco cardiovascular interferem nas respostas de ajuste ao processo de hipertensão como a hipertrofia cardíaca e vascular e ao aumento do risco ou simplesmente dependem da atenuação do processo de homeostasia e aumento da variabilidade da PA e redução da variabilidade da FC.

De qualquer forma, é provável que a liberação do controle tônico inibitório que os barorreceptores exercem sobre a atividade simpática gerada centralmente (Irigoyen et al., 1995) permita seu aumento para a periferia e desencadeie a potenciação das respostas de ajuste. Não existem dados conclusivos se essas respostas dependem do aumento do simpático ou dos aumentos associados da PA e da variabilidade da PA. Informações nesse sentido poderão contribuir para o melhor manejo de processos associados à redução da sensibilidade do barorreflexo.

1.2 Barorreceptores arteriais e desnervação sinoaórtica

Os pressorreceptores aórticos e carotídeos constituem-se em terminações nervosas livres na parede do vaso e são considerados o mais importante mecanismo de controle momento-a-momento da PA (Krieger e Michelini, 1992). Os pressorreceptores exercem ação no controle reflexo sobre o débito cardíaco e a resistência periférica, graças às

múltiplas conexões no sistema nervoso central. A comprovação da ação inibitória dos pressorreceptores sobre a atividade simpática é dada pelo efeito hipertensor agudo após sua retirada. A secção cirúrgica das fibras aferentes dos pressorreceptores é denominada desnervação sino-aórtica (DSA) e foi descrita no rato por Krieger (1964). A DSA leva a uma conseqüente ativação de vias simpáticas principalmente para coração, rins e vasos de resistência, provocando elevação da PA e aumento de sua labilidade (Krieger, 1970, 1984).

Na fase inicial da DSA, o aumento da atividade simpática e da PA é predominante (Irigoyen et al., 1988); já na fase crônica, a normalização da PA e atividade nervosa simpática renal refletem o balanço entre efeitos opostos entre pressoreceptores e quimiorreceptores (Irigoyen et al., 1995). Uma característica importante deste modelo é o aumento da labilidade da pressão, que se mantém mesmo após a normalização dos níveis pressóricos (Barres et al., 1992; Miao et al., 2006).

No início da década de 1980, Friberg e colaboradores (1982) demonstraram que a variabilidade da PA (VPA) estava aumentada em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), se comparados a linhagens de ratos normotensos. No ano seguinte, Mancia e colaboradores (1983), estudando grupos de pacientes normotensos, com hipertensão moderada e hipertensão severa, demonstraram que havia um aumento da VPA quanto mais grave a hipertensão. Estes e outros estudos abriram caminho para o uso de um modelo de alta VPA e sem hipertensão, consistindo na DSA crônica (Su e Miao, 2001).

1.3 Desnervação sinoaórtica, variabilidade da pressão arterial e hipertrofia cardíaca

A DSA, com a interrupção das vias aferentes que sinalizam a atividade dos pressorreceptores para o sistema nervoso central, tem sido utilizada como um modelo para o estudo da influência do reflexo comandado por estes receptores (barorreflexo) no controle da circulação (Su e Miao, 2001; Miao e Su, 2002; Miao et al., 2003; Miao et al., 2006). Embora no passado a DSA tenha sido usada como um modelo de hipertensão neurogênica, (Krieger, 1964) sabe-se atualmente que a hipertensão é temporária e restringe-se à fase aguda. (Franchini e Krieger, 1992; Irigoyen et al., 1995) e que, na realidade, a lesão de órgãos alvo nesse modelo cronicamente, pode estar mais relacionada à labilidade da PA, que permanece, do que aos níveis de PA propriamente ditos, que retornam aos valores de normalidade (Norman et al., 1981; Miao et al., 2006). Apesar das informações de que a atividade simpática renal aumentada na fase aguda também retorne ao normal na fase crônica da DSA (Irigoyen et al., 1995), não se sabe se isto é extensivo a todos os territórios; mesmo porque a resposta hipotensora ao hexametônio, um bloqueador de placa, permanece sempre maior nos animais com DSA, indicando maior tônus simpático ou menor controle da resposta do simpático, uma vez que não existem barorreceptores atuantes (Just et al., 1995).

Embora este modelo tenha sido muito bem caracterizado quanto ao controle autonômico da pressão arterial e à regulação do sistema renina-angiotensina (Paull et al., 1997) mostra-se um campo pouco explorado no que diz respeito à regulação das câmaras cardíacas e ao papel da variabilidade da pressão arterial sobre a estrutura do sistema cardiovascular. Além disso, a relação entre a VPA, o controle barorreflexo e os

mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca em diferentes modelos de hipertensão estão pouco estudados.

A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) é uma adaptação reconhecida do miocárdio para reduzir o estresse pressórico sobre as paredes da câmara ventricular (Bing et al., 1995). A alteração na massa e na geometria da câmara permite que o ventrículo se adapte ao aumento de trabalho cardíaco mantendo a sua fração de ejeção. Seguindo o III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial (1998), essa hipertrofia é um importante indicador de risco para arritmias e morte súbita, independentemente da própria hipertensão. Se o estímulo for persistente, surgirão alterações na função miocárdica que levam à insuficiência cardíaca (Cicogna et al., 1997).

O aumento na massa ventricular esquerda pode representar um marcador de falência do órgão, decorrente do longo efeito deletério da hipertensão arterial. Neste sentido, as observações do estudo de Framingham demonstram que também há associação entre risco cardiovascular aumentado e surgiram para melhor entender e avaliar os efeitos da hipertrofia ventricular esquerda sobre a incidência de eventos cardiovasculares e mortalidade (Miel e Vassalo, 2001).

Existem relatos de que a hipertrofia ventricular esquerda quando presente é modesta em ratos com DSA, com índices entre 11% e 16% de aumento do ventrículo esquerdo observado em 6, 10 e 16 semanas após a cirurgia de desnervação (Miau e Su, 2002), quando comparados esses índice com aqueles observados em SHR (30%) (Lo et al., 1990) e na hipertensão renal, 2K1C e 1K1C (32%) (Jones e Floras, 1980). Esses dados parecem indicar que a hipertensão mais do que a labilidade é o fator crítico para o desenvolvimento da HVE.

Embora a desnervação crônica não esteja associada à hipertensão, poderia a disfunção barorreflexa estar associada com a lesão de órgão alvo na hipertensão ? Se o aumento da variabilidade da PA pode contribuir para a HVE e para a lesão de órgão alvo, mesmo na ausência de hipertensão (Martinka et al., 2005) alternativamente, a HVE poderia também ser causada pela associação de hipertensão e labilidade da PA, uma vez que na hipertensão espontânea em ratos existe aumento da VPA (Dias et al., 2002) e redução da sensibilidade do baroreflexo (Brum, 2000; Berecek, 1991). Considera-se ainda dados da literatura (Osborn, 1990) e de nosso laboratório de que a desnervação sinoaórtica crônica não induz aumento adicional da PA em SHR, da mesma forma que acontece em animais normotensos (Moraes-Silva, 2010). Isso torna o modelo do SHR associado à DSA, como o modelo ideal para avaliar o efeito da variabilidade da PA relacionado à disfunção barorreflexa, no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, quando comparados a animais somente hipertensos: os mesmos níveis pressóricos, mas maior variabilidade no SHR com DSA (Miao et al., 2003; Miao et al., 2006; Moraes-Silva, 2010)

1.4 Hipertensão espontânea

O SHR, modelo genético de hipertensão espontânea, seguramente é o modelo que muito se assemelha à hipertensão primária no homem (Trippodo e Frohlich, 1981 apud Bing et al., 1995). Isto porque apresenta respostas hemodinâmicas e endócrinas semelhantes as do homem com hipertensão essencial (Seals et al., 1994). Sharma e colaboradores (1985) afirmam que este modelo de hipertensão tem uma vantagem sobre os outros, pois apresenta um aumento gradual da PA. A HVE é descrita em grande parte de trabalhos como uma compensação que ocorre em primeiro momento para manter

normal a função do ventrículo esquerdo (Pfeffer et al., 1978 e 1979 apud Sharma et al., 1985) e a mecânica miocárdica (Sharma et al., 1985). Precocemente esses animais desenvolvem HVE, que é responsável pela manutenção da função cardíaca normal, apesar da elevada PA sistêmica (Adams et al., 1989; e Cicogna et al., 1997).

O remodelamento cardíaco, assim como o vascular, é uma alteração presente na hipertensão que pode estar relacionada a diferentes mecanismos fisiopatogênicos. A hipertrofia ventricular esquerda observada em SHR, demonstrada pela relação peso ventricular esquerdo / peso corporal aumentada em 20 semanas, tem sido associada com o aumento da expressão do gene da ECA, conforme já descrito por Schunkert e colaboradores (1990) sugerindo que o sistema renina angiotensina (SRA) esteja diretamente envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Sabe-se, entretanto, que a massa do ventrículo esquerdo pode variar de acordo com diversos outros fatores, como por exemplo, obesidade, idade, viscosidade do sangue, ativação do sistema nervoso autônomo, ingestão de sal, além de diferentes determinantes genéticos (Mancia et al., 1997).

Embora se reconheça uma redução da sensibilidade do barorreflexo na hipertensão espontânea em ratos, o papel da desnervação completa desses receptores associada ao aumento da variabilidade da PA sobre o desenvolvimento da HVE, não foi totalmente esclarecido (Miao et al., 2006).

Confirmando dados epidemiológicos que mostram que a sensibilidade do barorreflexo está relacionada com o prognóstico após evento cardiovascular (La Rovere et al., 1998), dados que mostraram que animais desnervados apresentam uma maior resposta hipertrófica à hipertensão renovascular assim como uma maior mortalidade quando submetidos à oclusão coronariana (Mostarda et al., 2010). Esses dados em conjunto

sugerem um papel protetor do barorreflexo na resposta de ganho de massa do ventrículo esquerdo à hipertensão.

Conforme estabelecido por Dogrell e col. (1998), a hipertensão espontânea em ratos é um modelo realístico da hipertrofia em humanos desde que a hipertrofia cardíaca em humanos é usualmente associada com a hipertensão crônica. Este modelo preenche os critérios para tal, uma vez que permite estudos na fase crônica da doença estabelecida e produz sintomas que são previsíveis e controláveis e permite ainda medidas de parâmetros relevantes: cardíacos, bioquímicos e hemodinâmicos (Doggrell e Brown, 1998).

De fato, embora reconhecido como marcador de prognóstico frente a diferentes patologias do sistema cardiovascular (La Rovere, 1998), a sensibilidade do barorreflexo tem sido pouco estudada com relação à evolução das alterações estruturais do miocárdio. Trabalhos de Miao e col. (2002, 2003, 2004 e 2006) utilizando o modelo da DSA tem demonstrado repetidamente a importância desse mecanismo homeostático na resposta adaptativa do sistema cardiovascular, independentemente do nível da PA, ao comparar ratos desnervados normotensos e ratos SHR.

1.5 Marcadores de hipertrofia cardíaca

A gênese da hipertrofia dos miócitos é um processo complexo, envolvendo a geração de sinais do sarcolema, que, por sua vez, originam os mensageiros intracelulares os quais regulam a atividade gênica necessária ao crescimento da célula. Os vários fatores que causam a hipertrofia agem por ação direta e também por mecanismos indiretos sobre os cardiomiócitos, de tal forma que fatores mecânicos,

neurais e hormonais são desencadeados simultaneamente ou em seqüência, na indução da hipertrofia cardíaca (Franchini, 2001).

Alguns aspectos relacionados com a resposta hipertrófica patológica são semelhantes às etapas do desenvolvimento do coração durante o período fetal ou perinatal, sendo, por isso, denominadas de “reprogramação fetal”. Em animais experimentais com hipertrofia cardíaca são observados padrões de expressão gênica característicos do período fetal, como o reaparecimento de beta miosina de cadeia pesada (β -MCP) e do fator natriurético atrial (ANP). Além da expressão da β -MCP ocorre também mudança na expressão da α -actina esquelética, cuja alteração na composição das proteínas contráteis do coração determina alterações na capacidade contrátil do miocárdio, podendo levar à diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros observada no miocárdio hipertrofiado. A hipertrofia patológica também altera o relaxamento do ventrículo e caracteriza-se por um aumento na duração do relaxamento e alterações no metabolismo do cálcio (Nadal-Ginard e Mahdavi, 1989, Parker e Schneider, 1991, Chien et al., 1991). Este tipo de hipertrofia também leva a uma alteração na expressão gênica de proteínas não contráteis, como o aumento da expressão do ANP, que está mais bem caracterizado. No desenvolvimento embrionário, o gene que codifica o ANP é expresso tanto no átrio quanto no ventrículo, mas logo após o nascimento sua expressão é diminuída no ventrículo permanecendo o átrio como sítio primário de síntese do ANP no miocárdio adulto. Em resposta a diversos estímulos (hormonal, sobrecarga de pressão e volume, hipertensão, genéticos etc) que induzem à hipertrofia do ventrículo ocorre a re-expressão do ANP nas células ventriculares, o que representa a reprogramação de um gene embrionário na hipertrofia cardíaca. Portanto, supõe-se que o ANP pode participar da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia, embora o significado fisiológico deste aumento de expressão

do ANP no ventrículo permaneça desconhecido. A expressão do gene do ANP no ventrículo e as alterações da expressão da β -MCP e da α -actina esquelética podem ser consideradas um dos critérios que podem distinguir estímulos simplesmente tróficos, que aceleram o crescimento normal, como o treinamento físico, de estímulos que são fundamentalmente hipertróficos, indicando o começo de uma resposta patológica (Izumo et al., 1988, Chien et al., 1991, Krieger, 1995). Este conjunto de alterações começa a fazer parte do quadro das características da hipertrofia cardíaca patológica, determinando as modificações morfológicas, estruturais, bioquímicas e genéticas do miocárdio hipertrofiado, como ocorre na hipertensão.

A expressão destes genes, considerados como marcadores de hipertrofia cardíaca, será estudada neste trabalho para a caracterização dos efeitos do sistema nervoso autônomo, modulado pelo barorreflexo, na determinação da hipertrofia cardíaca uma vez que não existem dados na literatura nesse sentido.

1.6 Hipertensão pulmonar

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma patologia caracterizada pelo aumento da resistência dos vasos pulmonares, aumento na pressão Arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito, prejudicando as trocas gasosas alveolares e a função cardíaca.

É uma condição patológica e está presente quando a pressão sistólica pulmonar e pressão média excedem 30 e 25 mmHg respectivamente em repouso ou quando a pressão sistólica excede 35 mmHg e a pressão média pulmonar é superior a 30 mmHg durante o esforço (Jornal Brasileiro de pneumologia, 2005).

O remodelamento patológico dos vasos pulmonares ocorre frente a estímulos injuriantes de diferentes naturezas produzindo substâncias como citocinas e fatores de crescimento que levam às alterações nas células musculares lisas da túnica média alterando a espessura dessa camada. Além da hipertrofia da camada média, há um aumento na deposição de componentes da matriz extracelular como colágeno e elastina (Egito et al., 2003). O remodelamento da artéria pulmonar tem sido considerado uma das principais causas do aumento da pressão da artéria pulmonar (Xie et al., 2010).

A inflamação tem um papel importante no desenvolvimento e na manutenção de lesões morfológicas das artérias pulmonares na HAP evidenciado pela presença de infiltrado inflamatório na adventícia e na parede das artérias pulmonares (Perros., 2011; Dahal et al., 2011).

Através de métodos não invasivos como a ecocardiografia a HAP tem-se tornado um diagnóstico muito comum na prática clínica. Vários estudos na literatura em modelos de ratos têm demonstrado que o fluxo da artéria pulmonar é detectável através do ecocardiograma e que pode ser usado como uma ferramenta de avaliação da HAP (Jones et al., 2001; Koskenvuo et al., 2010; Thibault et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que a DSA tem provocado várias formas de lesões de órgão alvo. No entanto, pouco se tem explorado no que diz respeito a aspectos fisiopatológicos e estruturais da vasculopatia pulmonar em relação à sensibilidade do barorreflexo.

Se o aumento da variabilidade da PA pode contribuir para a hipertrofia ventricular direita (HVD) e para a lesão de órgão alvo, mesmo na ausência de hipertensão poderia a HAP ser causada pelo aumento da variabilidade da PA independentemente do nível da PA?

Considerando que dois dos principais marcadores da atividade do sistema nervoso autônomo são a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade da frequência cardíaca, bem como o fato de que a disfunção autonômica está associada com o aumento da mortalidade, especialmente em hipertensos e sujeitos com história de doenças cardiovasculares (Gerritsen et al., 2001) e, além disso, considerando a escassa informação na literatura sobre a evolução da resposta hipertrófica e da HAP relacionadas com a modulação autonômica do coração e da circulação, no presente estudo testaremos a hipótese de que o prejuízo do barorreflexo, com ou sem o aumento da PA, pode induzir o remodelamento cardíaco e da artéria pulmonar por alterar a modulação autonômica comandada pelos barorreceptores arteriais sobre coração e vasos.

2. OBJETIVO

Diante da hipótese levantada sobre a importância do barorreflexo nos parâmetros cardiovasculares e pulmonares, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a influência da integridade dos pressorreceptores arteriais no remodelamento cardíaco e da artéria pulmonar por alterar a modulação autonômica comandada pelos barorreceptores arteriais sobre coração e vasos.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (Wistar), com ou sem desnervação sinoaórtica (DSA) alterações:

1. hemodinâmicas: pressão arterial e frequência cardíaca;
2. autonômicas: sensibilidade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial nos domínios do tempo e da frequência;
3. de função cardíaca: parâmetros de função sistólica e diastólica dos ventrículos direito e esquerdo avaliadas pela cateterização ventricular (medidas invasivas) e pelo ecocardiograma (medidas não invasivas);
4. morfométricas cardíacas e pulmonares: avaliadas pelo ecocardiograma, pela expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca, e pela histologia de coração e pulmão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupos experimentais

A presente tese teve a aprovação do seu projeto pela comissão de ética para análises de projetos de Pesquisa (CAPPesq) da diretoria clínica do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número do protocolo: 1226/06).

Para a realização dos experimentos foram utilizadas ratos Wistar e SHR machos, 2 meses de idade provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24° C) e controladas (ciclo de horas 12 horas claro/escuro), com acesso irrestrito à água e comida (dieta normoprotéica - 12% proteínas). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais e avaliados após 10 semanas de acompanhamento:

- Grupo normotenso (GN): ratos Wistar (n=8).
- Grupo normotenso Desnervado (GND): ratos Wistar desnervados (n=8).
- Grupo SHR Controle (GH): animais SHR (n=8);
- Grupo SHR Desnervado (GHD): animais SHR desnervados (n=8);

3.2 Delineamento do protocolo experimental

Semana 0

- distribuição randômica dos animais nos seus respectivos grupos;
- pesagem dos animais;
- cirurgia de desnervação sinoaortica.

Semana 1 à 10

- acompanhamento dos animais.

Semana 10

- pesagem dos animais;

Dia 1

- ecocardiografia.

Dia 2

- canulação da veia e artéria femorais;

Dia 3

- avaliações hemodinâmicas e da sensibilidade do barorreflexo

Dia 4

- cateterização do ventrículo esquerdo e direito;
- eutanásia dos animais por perfusão para coleta de tecido cardíaco e pulmonar;
- eutanásia dos animais por decapitação para coleta de tecido cardíaco para expressão gênica.

Dia 5

- a partir do quinto dia, avaliações hemodinâmicas, histológicas e da expressão gênica.

3.3 Desnervação sinoaórtica

Os animais dos grupos GND e GHD foram submetidos à desnervação sino-aórtica (DAS). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p., Hypnol veterinário 30%; Fontoveter, Brasil) e, para o procedimento cirúrgico, posicionados em decúbito dorso-ventral / crânio-sacral em mesa aquecida. O procedimento consistiu de uma incisão mediana na região cervical anterior, separando-se os músculos pré-traqueais e localizando-se bilateralmente o feixe vaso nervoso,

constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático (Krieger,1964). As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado foram seccionadas. A bifurcação da carótida comum foi localizada, exposta e dissecada completamente nos dois lados, seccionando-se as fibras carotídeas e destruindo-se o corpúsculo carotídeo. Finalmente, o outro contingente de fibras pressorreceptoras aórticas que podem situar-se junto ao laríngeo inferior também foi interrompido ao seccionar-se o laríngeo superior (Krieger e Marseillan, 1963). As figuras 1 e 2 ilustram os procedimentos descritos.

Figura 1. A) Visão ventral do animal com incisão expondo a musculatura do pescoço;
B) Visão do feixe váscuo-nervoso após afastamento da musculatura do pescoço.
(Desenho S. Lacchini)

Figura 2. Inervação do corpo carotídeo e dos pressorreceptores carotídeos da bifurcação da carótida. (Desenho S. Lacchini)

3.4 Avaliação ecocardiográfica

Ao final das 10 semanas de acompanhamento, os animais dos quatro grupos foram submetidos à avaliação ecocardiográfica. As medidas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978). Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com uma solução de Ketalar (50 mg/Kg; i.p.) e Rompum (12 mg/Kg; i.p.). Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. O transdutor utilizado foi linear e multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensionais e monodimensionais simultâneas, além da análise

de fluxo por efeito Doppler espectral. Foram realizados os registros eletrocardiográficos mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2cm. Foram utilizadas as janelas longitudinais paraesternais direitas para a obtenção dos cortes longitudinal e transversal e as janelas longitudinais paraesternais esquerdas para a obtenção dos cortes apicais (duas, quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme descrito por Schiller et al. (1979), com as seguintes medidas: espessura diastólica do septo interventricular (SVDIA), cavidade do ventrículo esquerdo (VE) ao final da diástole (VEDIA) e espessura diastólica da parede posterior. A massa ventricular esquerda (MVE) foi então obtida a partir da fórmula: $1,047 \times [(SIVDIA + VEDIA + PPDIA)^3 - VEDIA^3]$ onde: 1,047 representam a densidade do miocárdio, validada em ratos por Fard et al. (2000). A MVE foi também corrigida pelo peso corporal (valor absoluto / peso corporal do animal). A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE%), pelo método Simpson modificado e também pela velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg), cujas fórmulas estão a seguir:

Simpson modificado :

$$V = \left(\frac{\pi}{4} \right) \sum_{i=1}^{20} a_i b_i \times \left(\frac{L}{20} \right)$$

onde L = comprimento do ventrículo esquerdo dividido em 20 discos (i= 1 a i= 20) da base ao ápice, com o diâmetro de cada disco determinado em duas visões apicais (a e b). Com este procedimento feito tanto na diástole como na sístole, obtivemos os respectivos volumes (diastólico e sistólico), o qual permitiu o cálculo da fração de ejeção: $FE = (\text{volume diastólico final} - \text{volume sistólico final} / \text{volume diastólico final}) \times 100\%$. Desta maneira, também obtivemos as medidas do eixo do VE, assim como a área do mesmo. A velocidade de encurtamento

circunferencial foi obtida pela seguinte fórmula: $VEC = (VEDIA - VESIS) / (VEDIA \times TE)$, onde TE = tempo de ejeção.

A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do VE, obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral. Foi determinada a onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo), em milissegundos (ms). A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo. Foi determinado o TRIV em “ms”, entre o final do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo e o início do fluxo diastólico mitral.

Entretanto, além das avaliações da função sistólica e diastólica separadamente, utilizamos um outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IDM), derivado de intervalos obtidos pelo Doppler pulsátil. Validado em camundongos por Broberg et al.(2003), o IDM é conceitualmente simples e representa a razão do tempo total gasto na atividade isovolumétrica (contração e relaxamento isovolumétricos) pelo tempo de ejeção. Para tanto, mede-se o tempo de relaxamento da válvula mitral (a), que corresponde à soma do tempo de contração isovolumétrica, tempo de ejeção e tempo de relaxamento isovolumétrico. O tempo de ejeção é obtido pela medida da duração do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo (b). Pela fórmula $(a) - (b) / b$, podemos então obter o IDM.

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfológicos do VD: volume diastólico do VD corrigido pelo peso, volume sistólico do VD corrigido pelo peso. A função sistólica

do VD foi avaliada pela Fe do VD que foi calculado pela razão entre volume diastólico menos volume sistólico pelo volume diastólico.

Os parâmetros de função do VD foram avaliados pelo Doppler tecidual, através do índice de velocidade de relaxamento rápido ventricular do tecido do VD (E'_{VD}), o índice de velocidade de relaxamento tardio ventricular do tecido do VD (A'_{VD}), e da relação das ondas E'_{VD} e A'_{VD} .

O tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) foram avaliados para se investigar a hipertensão pulmonar. A PMAP foi calculada a partir da seguinte formula $PMAP = 79 - 0,45 (TAAP)$.

3.5 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

3.5.1 Canulação

Após 24 horas das avaliações ecocardiográficas, os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xylazina (12mg/kg) por via intraperitoneal para a colocação de catéteres de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm que foi conectado ao PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e posicionadas no interior da aorta abdominal e da veia cava inferior, através da artéria e veia femoral esquerdas para registro de pressão arterial, frequência cardíaca e administração de drogas, respectivamente. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vasculo-nervoso, as extremidades das cânulas com menor calibre (PE-10) foram introduzidas na artéria e na veia femoral (figura 3). No dia seguinte, após os registros hemodinâmicos, um segundo cateter de polietileno (PE-50) foi utilizado para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria

carótida direita, sendo sua posição determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular e confirmada por necropsia.

As cânulas foram fixadas com fio de algodão, na artéria e na veia e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutâneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil, Fontoura-Wyeth, 60.000 U). Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10 cm) durante a realização do experimento (De Angelis et al. 1997, 1999).

Figura 3. Esquematização do procedimento da canulação. A) Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral. B) Isolamento da artéria femoral e inserção da cânula.

3.5.2 Registro de pressão arterial

Vinte e quatro horas após a canulação, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, foi conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2 Quintron Instrumnet Inc, EUA). Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2Kz, DATAQ Instruments, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca (Figura 4). Os valores de frequência cardíaca foram determinados a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calcularam a média e o desvio padrão da PAM, PAS, PAD e FC para cada animal. A variabilidade da PAM foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal estudado.

Figura 4: Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado)

3.5.3 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores

Feito o registro da PA e da FC, e após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

A sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio.

A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante é a vasoconstrição das arteríolas periféricas, foi injetada em doses crescentes na cânula da veia femural. Tal fármaco foi utilizado, portanto, para causar aumento da pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos pressorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa dos vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores arteriais.

Fenilefrina (0,25-32,0 µg/Kg) e nitroprussiato de sódio (0,05-1,6 µg/Kg) foram infundidas randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco. As doses foram infundidas *in bolus*, de maneira progressiva, sendo que cada dose era dado um intervalo suficiente para que a PAM e FC retornassem aos valores próximos do basal. Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores basais. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi comparada com os valores de frequência cardíaca do período basal, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. Os índices de bradicardia e taquicardia reflexas foram calculados pela razão entre o delta de variação da FC pelo delta de variação da PAM (ITR = índice de taquicardia reflexa e IBR= índice de bradicardia reflexa). (De Angelis et al. 1997, 1999).

3.6 Análise espectral (Transformada Rápida de Fourier-FFT)

Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios do intervalo de pulso, frequência cardíaca, pressão arteriais sistólica e diastólica e as variabilidades dos intervalos de pulso, da pressão arterial sistólica e da pressão

arterial diastólica foram quantificadas pelo do desvio padrão (IP.dp, FC.dp, PAS.dp e PAD.dp, respectivamente).

Para a análise no domínio da frequência, a potência foi obtida usando-se o Método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (MATLAB 6.0, Mathworks, Inc). As potências para as bandas de muito baixa (MBF, 0,0-0,20 Hz; modulação humoral), baixa (BF, 0,20-0,75 Hz; modulação simpática) e alta (AF, 0,75-4,0 Hz; modulação parassimpática) frequências foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de BF e AF foram divididas pela variância subtraída da potência na banda MBF (Pagani et al., 1986; Soares et al., 2004). O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foi estimado pela função de coerência. Um valor de coerência (K) maior que 0.5 foi considerado significativo.

3.7 Avaliações da função ventricular pela cateterização dos ventrículos esquerdo e direito

Ao final das avaliações hemodinâmicas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (0,1mL/100g; via cânula previamente inserida na sua veia femoral) e um cateter de polietileno P50 foi utilizado para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria carótida direita, e do ventrículo direito via veia jugular direita. O cateter foi inserido até o ventrículo e sua posição determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular.

Antes da colocação do cateter P50 no ventrículo, a pressão arterial da carótida foi registrada durante 5 minutos através da conexão da cânula arterial a um transdutor de pressão (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2 Quintron Instrumnet Inc, EUA). Sinais de pressão ventricular esquerda e direita foram gravados durante um período de 5 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, 1Kz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de máxima pressão sistólica ventricular, pressão diastólica final (PDF) e derivadas de contração ($+dP/dt$) e relaxamento ($-dP/dt$) do VE e do VD. A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calcularam a média, desvio padrão e o erro da $+dP/dt$ e da $-dP/dt$ para cada animal. A PDF foi determinada pela detecção manual do ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do VE e do VD. Foram realizadas no mínimo 20 detecções por registro.

3.8 Eutanásia

Após o término do protocolo experimental, os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro foram sacrificados por overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 40mg/Kg) e perfundidos com KCl a 14mM em soro fisiológico. O segundo grupo foi decapitado e coração dissecado e congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -80°C . Foram retirados os tecidos de interesse e os cadáveres foram colocados em

sacos específicos para lixo biológico e mantidos em refrigerador para serem incinerados pela empresa responsável.

3.9 Avaliação da hipertrofia ventricular

Para a morfologia, o coração foi dissecado para separar o ventrículo direito e o esquerdo (parede livre e septo) e pesados. O ventrículo esquerdo e o ventrículo direito foram congelados em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -80°C para análises bioquímicas e moleculares. Para a morfometria, o coração foi perfundido com KCl a 14mM em soro fisiológico para que este pare em diástole. O coração foi retirado e mantido em solução de formol a 4% para fixação e incluído em parafina para cortes e colorações específicos.

A hipertrofia cardíaca foi avaliada pesando-se o ventrículo esquerdo e direito separadamente (peso úmido). Os resultados foram expressos pela relação entre o peso do ventrículo esquerdo e ventrículo direito pelo peso corporal do rato (mg/g).

3.9.1 Diâmetro de cardiomiócitos

Foram realizados cortes histológicos de 5 μm de espessura no ventrículo esquerdo, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a visualização das estruturas celulares. Dois cortes de VE para cada animal foram selecionados aleatoriamente para visualização dos cardiomiócitos em microscópio óptico utilizando objetiva de imersão com aumento de 40x. A imagem do cardiomiócito foi obtida na tela do computador e o diâmetro transversal de cada miócito cardíaco isolado foi

traçado manualmente utilizando-se o sistema Quantimet (Leica). A linha traçada atravessa o centro do núcleo do miócito e com a imagem digitalizada o computador calcula a área (Moraes-Silva, et al.,).

3.9.2 Quantificação de colágeno

Fração volume de colágeno cardíaco

As lâminas contendo os cortes dos ventrículos foram coradas com *picro sirius red* para a visualização de fibras do colágeno intersticial no microscópio óptico (Junqueira et al., 1979). Foram avaliados aproximadamente 20 campos visuais para cada amostra. Utilizou-se uma objetiva de 20X. A porcentagem de colágeno cardíaco foi medida utilizando-se o software Image Pro Plus 6.0. A imagem captada foi analisada utilizando-se uma grade com pontos equidistantes na qual foram marcados os pontos de intersecção entre linhas os quais incidiram sobre áreas contendo colágeno. Foram analisados VD e VE separadamente (Piratello et al; 2010).

Para quantificação do colágeno cardíaco a fração de volume de colágeno (FVC) foi calculada pela razão percentual da área do tecido miocárdico corado positivamente para as fibras de colágeno (quantidade absoluta de colágeno) pela área total do tecido miocárdico.

Dosagem de Hidroxiprolina

A concentração de hidroxiprolina (OH-Pro) foi determinada a partir da homogeneização do tecido cardíaco. O material estocado a -20° C foi descongelado e

hidrolizado com ácido clorídrico 8N, em estufa a 115° C por um período de 16 horas. Em seguida foi realizada a neutralização do material que foi feita através da adição progressiva de hidróxido de sódio (NaOH). Para oxidação do anel da OH-Pro foi utilizada uma solução oxidante que foi composta de cloramina e tampão de citrato. Após a oxidação foi utilizado um reagente de cor, chamado reagente de Ehrlich, e a OH-Pro foi determinada espectrofotometricamente.

3.9.3 Extração do RNA total e cDNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies, Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Ao término deste processo, o pellet de RNA foi diluído em água DEPC e homogeneizado. Em seguida, as amostras foram dosadas no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 260nm e 280nm. Após a quantificação do RNA total, realizou-se uma eletroforese para a verificação da integridade do RNA total extraído, em gel de agarose 1% a 90 Volts, corado com brometo de etídio. A partir de 1 µg de RNA total extraído foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm, o cDNA. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se as especificações fornecidas pelo fabricante da enzima (200U de Transcriptase Reversa SuperScript™, Invitrogen) em termociclador (MJ Research – PTC 200).

PCR em Tempo Real

A análise da expressão gênica do ANF, da α -actina e do colágeno tipo I e III, os quais são utilizados como marcadores de hipertrofia cardíaca, foram avaliadas através da técnica de PCR em Tempo Real no VE e no VD.

Com base no Ct, o qual representa a linha de base de detecção de fluorescência, correspondente à fase exponencial, é possível estimar a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. A expressão gênica é determinada através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, descrita por K. Livak no Manual do Usuário do Biosystem Sequence Detector Bulletin 2, onde $\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ amostra} - Ct \beta\text{-actina da mesma amostra}] - [Ct \text{ controle} - Ct \beta\text{-actina controle}]$.

Os resultados obtidos foram expressos com base na relação do mRNA de cada gene de interesse com os níveis de mRNA da β -actina. Para todos os genes investigados foram realizadas curvas de quantidades progressivas de cDNA e primers. As amostras foram processadas em triplicata ($n=3$ /grupo experimental) e em 2 experimentos independentes. Após a padronização dos diferentes primers, foram escolhidas as concentrações ideais de cDNA para cada primer, com o objetivo de que não houvesse saturação de amostra durante a reação. Para cada reação foi também utilizado um controle negativo, em duplicata, o qual não continha cDNA. As reações foram realizadas utilizando 300nM de cada primer, cDNA, H₂O DEPC e 6.25 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), em um volume final de 12.5 μ l/reação. As reações foram realizadas utilizando-se 40 ciclos e temperatura de anelamento de 60°C.

As seqüências dos primers utilizados encontram-se descritas na tabela a seguir:

Tabela 1: Desenho das seqüências dos “primers” utilizados.

<i>Gene</i>	<i>“Primer” sense: 5'- 3'</i>	<i>“Primer” antisense: 5'- 3'</i>
<i>α-actina esquelética</i> ¹ Gen Bank:BC014877	ACC ACA GGC ATT GTT GTG GA	TAA GGT AGT CGA TGA GGT CC
<i>ANF</i> ³	AGA ACC TGC TAG ACC ACC T	CAG AGA GGG AGC TAA GTG C
<i>Colágeno tipo I</i>	CGA GAC CCT TCT CAC TCC TG	GCA TCC TTG GTT AGG GTC AA
<i>Colágeno tipo III</i>	TGG TTT CTT CTC ACC CTG CT	TCT CCA AAT GGG ATC TCT GG

¹*Physiological Genomics*, 14:25-34, 2003; ²*Physiological Genomics*, 14:25-34, 2003; ³*Circulation*, 2005; 111:1510-1516.

3.10 Avaliação do remodelamento das arteríolas pulmonares

3.10.1 Avaliação morfométrica

Foram realizados cortes histológicos com micrótomo de 5 µm de espessura no pulmão, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a visualização das estruturas celulares. Escolheu-se de 6 a 8 artérias onde foram mensurados área interna do lúmen e a espessura da parede através da razão entre ao área interna do lúmen sobre a área da parede. Foram obtidas imagens das lâminas no microscópio Leica 40X sendo

realizada a análise histológica das artérias pulmonares utilizando-se o *software* Image Pro Plus.

Figura 5: Esquema representativo de ácino pulmonar, com presença de bronquíolo respiratório terminal, bronquíolo respiratório (BR), ducto alveolar, sacos alveolares, alvéolos e artérias pulmonares. As porções intra-acinares são o BR e os ductos alveolares. (Junqueira adaptado)

Ao lado de cada bronquíolo e ducto alveolar observa-se a presença de um ramo de artéria pulmonar. Alguns alvéolos apresentam também pequenas arteríolas em sua parede. São denominadas artérias ou arteríolas pré-acinares as que acompanham os bronquíolos maiores até o nível do bronquíolo terminal, já as artérias ou arteríolas intra-

acinares são denominadas por se situarem junto aos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e nas paredes dos alvéolos.

3.10.2 Quantificação de colágeno

Fração volume de colágeno pulmonar

A quantificação de colágeno vasculares das artérias intra-acinar, evidenciadas pela coloração de *picrossírius red* foi analisado através de um analisador de imagens acoplado a um microscópio óptico. Através de um sistema digital, as imagens foram processadas pelo software Image Pro-Plus. O cálculo da área das fibras em micrômetros foi dado através do reconhecimento da luz correspondente às fibras birrefringentes. O mesmo padrão de frequência foi utilizado para todas as lâminas evitando qualquer tipo de viés. Além das áreas de parede vascular correspondentes às fibras colágenas, também foi calculada, utilizando o mesmo software à área total da parede vascular, excluindo o espaço luminal, selecionada com o mouse.

A relação entre área de fibras colágenas e área total da parede vascular foi denominada de fração de área vascular das fibras.

3.11 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. O Teste de análise de variância (ANOVA) *two way* seguido de *post-hoc* de Student Newumann Keuls foram devidamente aplicados para análise dos dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. A correlação de Pearson foi usada para estudar as associações entre as variáveis.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal

A tabela abaixo ilustra o peso corporal dos grupos estudados. Os animais SHR com 2 meses de idade (semana 1) apresentaram menor peso corporal em relação aos ratos Wistar da mesma idade independente da desnervação sinoaórtica. De modo semelhante, ao final do protocolo, observa-se que os grupos GH e GHD apresentaram menor ganho de peso corporal em relação aos grupos não hipertensos (GN e GND).

Tabela 2: Peso corporal dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD) na primeira (inicial) e na décima semana (final).

	GN	GND	GH	GHD
Peso inicial (g)	223±4	223±4	210±2*†	207±2*†
Peso final (g)	423±8	421±8	306±5*†	296±6*†

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND.

4.2 Avaliação ecocardiográfica

A tabela e as figuras abaixo apresentam os valores das variáveis morfométricas cardíacas dos grupos estudados. O tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole corrigido (VEDIACorr), o septo interventricular corrigido (SIVDIACorr) e parede posterior do ventrículo corrigido (PPDIACorr) apresentaram-se maiores nos grupos hipertensos (GH e GHD) em relação aos grupos normotensos (GN e GND). Além disso, o (SIVDIACorr) e a (PPDIACorr) apresentaram-se maiores no grupo GHD quando comparado ao GH.

Já os valores de espessura relativa da parede (ERP) e MVEcorr peso apresentaram-se maiores nos grupos (GND, GH e GHD) quando comparados ao grupo GN. Além disso, MVEcorr peso apresentou-se maior nos animais GHD do que nos animais GH.

Além disso, apenas o grupo GHD apresentou maior valores do tamanho da cavidade do ventrículo direito na diástole corrigido (VDDIACorr) e do tamanho da cavidade do ventrículo direito na sístole corrigido (VDSISTcorr) comparado aos demais grupos estudados. (Tabela 3, Figura 6 e Figura 7).

Tabela 3: Variáveis ecocardiográficas de morfometria cardíaca dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
VEDIA_{CORR}	1,86±0,05	1,72±0,04	2,29±0,04*†	2,28±0,12*†
(cm/g)				
SIVDIA_{CORR}	0,30±0,01	0,33±0,02	0,45±0,01*†	0,51±0,01*†#
(cm/g)				
PPDIA_{CORR}	0,30±0,01	0,37±0,01*	0,46±0,01*†	0,52±0,02*†#
(cm/g)				
ERP (cm)	0,32±0,01	0,41±0,03*	0,41±0,01*	0,46±0,01*
MVE_{CORR}	3,53±0,09	3,66±0,15*	4,83±0,05*†	5,26±0,17*†#
peso (mg/g)				
VDDIA_{CORR}	1,50±0,05	1,51±0,06	1,76±0,05	2,90±0,17*†#
(cm/g)				
VDSIST_{CORR}	0,85±0,05	0,85±0,06	1,04±0,04	1,92±0,02*†#
(cm/g)				

Valores representam média ± EPM. * p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs.

GH.

Figura 6: Tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (VEDIAcorr), septo interventricular na diástole (SIVDIAcorr) e parede posterior do ventrículo (PPDIAcorr) corrigidos pelo peso corporal dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

Figura 7: Massa do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal (MVEcorr peso) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

A tabela abaixo ilustra os valores de função diastólica nos grupos estudados. A desnervação sinoaortica promoveu uma disfunção diastólica no grupo normotenso, GHD, evidenciado pelo maior tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV corr) e maior velocidade de fluxo de enchimento rápido ventricular (Onda E corr) quando comparado ao seu grupo GN. Além disso, podemos observar que os grupos hipertensos apresentam maior (TRIV corr) e maior (Onda E corr) quando comparado com os grupos normotensos.

O índice de velocidade de relaxamento rápido ventricular do VD (E'_{VD}) foi semelhante entre os grupos estudados. Já o índice de velocidade de relaxamento tardio ventricular do tecido do VD (A'_{VD}) foi menor no grupo GHD em relação ao grupo GND. No entanto a relação E'/A' foi semelhante entre os grupos estudados (Tabela 4).

Tabela 4: Variáveis ecocardiográficas de função diastólica dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
TRIV corr VE (ms)	1,5± 0,03	1,9± 0, 6*	2,2 ± 0,05*†	2± 0,03*†
ONDA E corr VE (ms)	2,3 ± 0,07	2,9 ± 0,13*	3 ± 0,06*	2,9 ± 0,08*
E' VD (ms)	0,042±0,004	0,044±0,004	0,038±0,002	0,036±0,002
A' VD (ms)	0,033±0,003	0,044±0,004	0,037±0,003	0,026±0,002†
E'/A'	1,28±0,10	1,08±0,16	1,15±0,12	1,48±0,17

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05.

A tabela abaixo compara os valores de função sistólica entre os grupos estudados. Apenas o grupo GND apresentou menor fração de ejeção (FEj) do VE quando comparado ao seu GC. A velocidade de encurtamento circunferencial (VEC) estava menor nos grupos: GND, GH e no GHD quando comparado ao GN. A fração de ejeção (FEj) do VD estava apenas significativamente menor no GHD quando comparado ao GN. (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5: Variáveis ecocardiográficas de função sistólica dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
FEj do VE (%)	72±0,91	64±1,56*	72±1,6†	73±2,38†
VEC (circ/seg*10³)	75 ± 0,9	48±0,4*	44±0,2*	50±0,3*
DC (ml/min)	113±4	83±7*	72±5*	52±4*†#
FEj do VD (%)	51±7	44±3	41±1	33±2*

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs GND; # p <0,05 vs. GH.

Figura 8: Débito cardíaco (DC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

A figura abaixo ilustra o parâmetro ecocardiográfico de função global, representado pelo índice de desempenho do miocárdico (IDM) do VE, o qual foi maior no grupo GND quando comparado ao grupo GN. O IDM foi semelhante entre os grupos hipertensos (GN: 0,37±0,12; GND: 0,68±0,12; GH: 0,55±0,02; e GHD: 0,49±0,02).

Figura 9: Índice de desempenho miocárdico (IDM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).
* $p < 0,05$ vs. GN.

Já o IDM do VD foi semelhante entre os grupos estudados (GN: $0,36 \pm 0,03$; GND: $0,35 \pm 0,05$; GH: $0,36 \pm 0,04$; e GHD: $0,47 \pm 0,06$).

As figuras abaixo ilustram o tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP), os quais tem sido aceitos como indicador de hipertensão pulmonar. O TAAP mostrou-se menor nos animais submetidos à DAS (GND: $33 \pm 1,0$ e GHD: $28 \pm 1,4$ ms) em relação aos grupos não desnervados (GN: $40 \pm 1,3$ e GH: $33 \pm 1,1$ ms). Vale ressaltar que a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA promoveu uma diminuição ainda maior no TAAP no grupo GHD. Paralelamente a isso, os grupos submetidos à DSA apresentaram maiores valores de PMAP, bem como o grupo GHD apresentou um aumento ainda maior da PMAP quando

comparado aos demais grupos estudados (GND: $68 \pm 0,5$ e GHD: $66 \pm 0,6$ ms) em relação aos grupos não desnervados (GN: $61 \pm 0,6$ e GH: $64 \pm 0,5$ mmHg).

Figura 10: Tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

Figura 11: Pressão média da artéria pulmonar (PMAP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

4.3 Avaliações hemodinâmicas

Conforme esperado, o grupo SHR apresentou valores elevados de PAS, PAD e PAM em relação ao grupo Wistar. A desnervação sinoaórtica não alterou os valores médios de PAS, PAD PAM e FC (Tabela 6 e Figura 12).

Tabela 6: Pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
PAD (mmHg)	89±1	92±3	141±2*†	140±3*†
PAS (mmHg)	123±2	125±3	191±3*†	189±3*†
PAM (mmHg)	104±2	106±3	166±2*†	164±3*†
FC (bpm)	313±6	329±3	327±3	337±4

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND.

Figura 12: Pressão arterial média (PAM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs .GN; † $p < 0,05$ vs. GND.

A principal característica do modelo experimental de DSA é o aumento da VPA, representada pela média dos desvios padrão (SDNN – expressa em mmHg), sem induzir aumento adicional nos níveis pressóricos dos animais SHR, da mesma forma que acontece nos animais normotensos. Os animais hipertensos (GH) apresentaram aumento VPA em relação aos normotensos (GN). Os grupos submetidos à desnervação sinoaórtica (GND e GHD) apresentaram variabilidade da pressão arterial média (VPAM), da pressão diastólica (VPAD) e da pressão arterial sistólica (VPAS), comprovando a influência do barorreflexo sobre este controle. Não foram observadas diferenças na VFC entre os grupos estudados (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7: Variabilidade da pressão arterial expressa pela média dos desvios padrão (DP), desvio padrão da pressão diastólica (DPPAD), desvio padrão da pressão arterial sistólica (DPPAS), desvio padrão da pressão arterial média (DPPAM) e desvio padrão da frequência cardíaca (DPVFC) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD) expressa pela média dos desvios padrões.

	GN	GND	GH	GHD
DPPAD (mmHg)	5±0,4	9±0,6*	8±0,7*	13±1*†#
DPPAS (mmHg)	6±0,4	9±0,7*	10±0,9*	14±0,6*†#
DPPAM(mmHg)	5±0,3	11±0,49*	8±0,5*	14±1*†#
DPFC (bpm)	19±2	14±1	18±2	21±2

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

Figura 13: Variabilidade da pressão arterial média expressa pela média dos desvios padrão (DP PAM) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

4.4 Sensibilidade barorreflexa

A sensibilidade barorreflexa, avaliada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio, mostrou-se prejudicada nos animais SHR (GH) em relação aos normotensos (GN). A desnervação completa desses receptores ocasionou uma redução da sensibilidade do barorreflexo nos grupos submetidos à DSA em relação aos seus respectivos grupos controles (GND vs. GN e GHD vs. GH). Além disso, a DSA induziu redução adicional da resposta bradicárdica nos animais hipertensos em relação aos normotensos (GHD vs GND) (Tabela 8, Figura 14).

Tabela 8: Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas à variações de pressão arterial dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
Resposta				
Taquicárdica	2,92±0,14	0,46±0,07*	1,08±0,04*†	0,56±0,05*#
(bpm/mmHg)				
Resposta				
Bradicárdica	1,68±0,12	0,49±0,06*	0,59±0,04*	0,28±0,03*†#
(bpm/mmHg)				

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs.

GH.

Figura 14: Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas às variações de PA dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

4.5 Variabilidade da frequência cardíaca expressa pelo intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo (variância) e da frequência (análise espectral, transformada rápida de fourier-FFT)

A variância do IP (VARIP) foi expressa em ms^2 para o tacograma, tanto na banda de baixa frequência (LF) quanto para a banda de alta frequência (HF). A VARIP, os componentes de baixa frequência (LF) e de alta frequência (HF) do intervalo de pulso foram maiores nos grupos hipertensos (GH e GHD) em relação aos grupos normotensos (GN e GND). Além disso, o HF foi menor no grupo GHD do que no GH. Em unidades normalizadas tanto o LF (%LF) quanto o HF (%HF) foram semelhantes entre os grupos estudados. O balanço autonômico (LF/HF) apresentou valor aumentado no grupo GHD quando comparado aos grupos GN e GND (Tabela 9 e Figura 15).

Tabela 9: Variabilidade do intervalo de pulso (IP) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
VARIP (ms ²)	45±7	45±9	140±49*†	125±20*†
LF (ms ²)	1,3±0,26	1±0,25	7,3±2,22*†	6,3±5,6*†
HF (ms ²)	9,1±1,64	6,4±1,19	27±5*†	16±2†#
% LF (N.U.)	11±1	16±2	20±3	22±3
% HF (N.U.)	89±1	84±3	80±3	78±3
LF/HF	0,1±0,01	0,2±0,02	0,2±0,03	0,3±0,04*†

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

Figura 15: Balanço Autonômico (LF/HF) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p<0,05$ vs GN; † $p<0,05$ vs GND.

A variância total da pressão arterial sistólica (VPAS) expressa em mmHg^2 , foi maior nos grupos com DSA (GD e GHD) em relação aos respectivos seus respectivos grupos controles (GN e GH). Além disso, o grupo GHD apresentou valores maiores de VPAS em relação aos demais grupos estudados. O componente de baixa frequência (LF) da PAS foi maior nos grupos GH e GHD em relação aos grupos GN e GND (Tabela 10).

Tabela 10: Variabilidade da pressão arterial sistólica (VARPAS) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
VARPAS (mmHg ²)	10±1	57±12*	50±5*	114±20*†#
LF (mmHg ²)	1,79±0,31	3,10±0,76	6,46±0,91*†	6,99±1,19*†

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

A figura abaixo ilustra o índice alfa do LF calculado pela raiz quadrada da razão entre o componente de baixa frequência do intervalo de pulso pela banda de baixa da PAS, o qual tem sido aceito como representativo da sensibilidade barorreflexa espontânea. O índice alfa do LF mostrou-se prejudicado nos animais submetidos à DSA (GND: 0,49±0,08 e GHD: 0,58±0,14 ms/mmHg) em relação aos grupos não desnervados (GN: 0,91±0,04 e GH: 1,024±0,12 ms/mmHg).

Figura 16: Índice alfa dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

4.6 Avaliações invasivas da função ventricular

Medidas invasivas da função ventricular foram avaliadas através da cateterização do VE e do VD. As derivadas de contração (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt) do VE e do VD, bem como a pressão arterial sistólica do VD não foram diferentes entre os grupos estudados (Tabela 11).

Tabela 11: Derivadas de contração (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt) do VE e do VD, e PAS do VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
+dP/dt do VE (mmHg/seg)	5807±473	4404±274	6131±1255	7737±306†
-dP/dt do VE (mmHg/seg)	3796±433	2794±266	5107±1292	5817±581†
+dP/dt do VD (mmHg/seg)	1253±77	1575±166	1651±395	1451±92
-dP/dt do VD (mmHg/seg)	928±84	1233±73	1016±246	1103±110
PASVD (mmHg)	31±1,3	38±3,4	37±5,3	43±3,7

Valores representam média ± EPM. * p <0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND.

A figura abaixo ilustra a pressão diastólica final, a qual tem sido um indicador de insuficiência cardíaca congestiva. A PDF foi significativamente maior nos grupos submetidos à desnervação quando comparado aos seus controles. Essas diferenças foram observadas tanto no VE (GN: 5,83±0,19 vs. GND: 8,09±0,29 e GH: 8,25±0,54 vs. GHD: 13,5±0,84 mmHg), quanto no VD (GN: 3,55±0,15 vs. GND: 4,85±0,15 e GH: 5,83±0,31 vs. GHD: 7,77±0,25 mmHg). Além disso, a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA induziu um aumento ainda maior na PDF do VE e do VD no grupo GHD.

Figura 17: Pressão diastólica final (PDF) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs GN; † $p < 0,05$ vs GND; # $p < 0,05$ vs GH.

4.7 Avaliação da hipertrofia ventricular

Conforme descrito na literatura, o grupo SHR apresentou hipertrofia ventricular esquerda demonstrada pelas relações peso coração / peso corporal (coração / peso corporal) e peso ventricular esquerdo / peso corporal (VE / peso corporal).

Paralelamente a isso, também observamos que a desnervação sinoaórtica promoveu hipertrofia ventricular direita tanto no grupo normotenso (GND) como no grupo hipertenso (GHD) quando comparados aos seus respectivos grupos controles demonstrada pelas relações peso ventricular direito / peso corporal (VD / peso corporal).

Adicionalmente pode-se observar que a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA induziu um aumento ainda maior no desenvolvimento da HVE e da HVD no grupo hipertenso (GH vs. GHD) (Tabela 11, Figura18).

Tabela 12: Parâmetros de hipertrofia ventricular esquerda e direita dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
Peso do coração (g)	1,34±0,02	1,74±0,05*	1,19±0,02*†	1,22±0,025*†
Peso do coração/Peso corporal (mg/g)	3,07±0,06	3,97±0,10*	3,67±0,08*†	4,20±0,09*#
Peso do VE (g)	0,89±0,01	1,03±0,02*	0,85±0,01	0,88±0,08
Peso do VE /Peso corporal (mg/g)	2,15±0,02	2,35±0,08*	2,76±0,05*†	3,03±0,07*†#
Peso do VD (g)	0,26±0,08	0,34±0,01*	0,16±0,03*†	0,20±0,01*†#
Peso do VD /Peso corporal (mg/g)	0,51±0,02	0,64±0,03*	0,61±0,01	0,82±0,04*†#

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs.

GH.

Figura 18: Peso do coração/peso corporal (coração/peso corporal) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs GN; † $p < 0,05$ vs GND; # $p < 0,05$ vs GH.

4.8 Diâmetro de cardiomiócitos

As áreas de secção transversa dos miócitos do VE são expressas em μm . A resposta hipertrófica foi observada com o aumento no diâmetro dos cardiomiócitos no VE nos grupos hipertensos (GH: $18,3 \pm 0,23$ e GHD: $19,5 \pm 0,30$ μm) quando comparados aos grupos normotensos (GN: $12,3 \pm 0,02$ e GND: $13 \pm 0,27$ μm). Além disso, área de secção transversa do miócito do VE apresentou-se maior nos animais GHD do que nos animais GH (Figura 19).

Figura 19: Diâmetro Cardiomiócitos dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs GN; † $p < 0,05$ vs GND; # $p < 0,05$ vs GH.

4.9 Quantificação de colágeno

Fração volume de colágeno cardíaco

As fibras colágenas são expressas em percentual de colágeno no VE e no VD. O aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular foi significativamente maior nos grupos submetidos à desnervação quando comparado aos seus controles. Tanto no VE (GN: $0,6 \pm 0,88$ vs. GND: $1 \pm 0,06$ e GH: $3,2 \pm 0,24$ vs. GHD: $6,5 \pm 0,77$ %), quanto no VD (GN: $0,016 \pm 0,006$ vs. GND: $0,047 \pm 0,004$ e GH: $0,065 \pm 0,001$ vs. GHD: $0,075 \pm 0,003$ %). Vale ressaltar que a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA induziu um aumento ainda maior na deposição de colágeno no grupo GHD. (Figuras 20, 21, 22 e 23)

Figura 20: Percentual de colágeno no VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

Figura 21: Imagens representativas de lâminas coradas com *picrosirius red* no VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

Figura 22: Percentual de colágeno no VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs. GH.

Figura 23: Imagens representativas de lâminas coradas com *picrosirius red* no VD dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

Dosagem de Hidroxiprolina

A concentração de hidroxiprolina (OH-Pro) é expressa em percentual de (OH-Pro) no VE. Os grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas, porém ambos os

grupos desnervados (GND: 85 ± 18 e GHD: 132 ± 36 %) apresentaram um aumento discreto na (OH-PRO) em relação aos seus respectivos grupos controles (GN: 71 ± 10 e GH: 100 ± 17 %) (Figura 24).

Figura 24: Percentual de concentração de hidroxiprolina (OH-Pro) dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

4.10 PCR em Tempo Real

A expressão do gene do ANP no ventrículo e as alterações da expressão da α -actina esquelética, do colágeno tipo I e tipo III são utilizados como marcadores de hipertrofia cardíaca já muito bem estabelecida pela literatura.

No presente estudo os animais normotensos com DSA apresentaram uma maior expressão dos genes ANP e da α -actina esquelética tanto no VE quanto no VD comparado ao seu respectivo grupo controle. Porém, os animais hipertensos submetidos à desnervação sinoaortica, apenas pode-se observar diferenças significativas na expressão do gene da α -actina esquelética no VD (Tabela 13).

Tabela 13: Expressão gênica de ANF do VE dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
ANF no VE	1±0,06	1,8±0,22 *	24,99±2,11*†	21,68±0,75*†
ANF no VD	0,89±0,13	1,56±0,12*	5,58±0,23*†	1,91±0,07*
α-actina				
esquelética no	0,90±0,11	3,36±0,53*	5,11±0,76*	6,23±0,52*
VE				
α-actina				
esquelética no	1±0,04	6,4±0,25*	6,04±0,41*	11,79±0,95*#
VD				

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND; # p <0,05 vs.

GH.

Corroborando com os dados de fração de colágeno a expressão gênica do colágeno tipo I e tipo III foram significativamente maiores nos grupos submetidos à desnervação quando comparado aos seus controles. Tanto no VE para colágeno tipo I (GN: 1,01±0,10 vs. GND: 6,81±0,13 e GH: 3,69±0,12 vs. GHD: 5,89±0,36 vezes de indução) e para o colágeno tipo III (GN: 1±0,03 vs. GND: 3,23±0,07 e GH: 3,03±0,03 vs. GHD: 6,57±0,10 vezes de indução). Quanto no VD para colágeno tipo I (GN: 1±0,004 vs. GND: 5,68±0,48 e GH: 7,27±0,29 vs. GHD: 38,9±1,83 % vezes de indução) e para o colágeno tipo III (GN: 1±0,11 vs. GND: 4,56±0,24 e GH: 32,9±1,52 vs. GHD: 79±1,16

vezes de indução). Vale ressaltar que a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA induziu um aumento ainda maior na deposição de colágeno no grupo GHD (Figuras 25 e 26).

Figura 25: Expressão gênica do colágeno tipo I no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

Figura 26: Expressão gênica do colágeno tipo III no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD). * $p < 0,05$ vs. GN; † $p < 0,05$ vs. GND; # $p < 0,05$ vs. GH.

4.11 Avaliação do remodelamento das artérias pulmonares

Morfologia do pulmão

Frente a estímulos injuriantes de diferentes naturezas, os vasos pulmonares sofrem alterações, conhecidas como remodelamento vascular patológico. A razão entre a área interna do lúmen sobre a área da parede da artéria pulmonar apresentou-se maior nos grupos (GND, GH e GHD) quando comparados ao grupo GN. Adicionalmente, pode-se observar que apenas o grupo normotenso submetidos à desnervação sinoaortica apresentou maior razão entre lúmen sobre o vaso quando com parado ao seu respectivo grupo controle (Tabela 14).

Tabela 14: Razão entre a área interna do lúmen sobre a área da camada média da artéria pulmonar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

	GN	GND	GH	GHD
Lúmen/camada				
média	0,59±0,12	0,73±0,22 *	2,09±2,21*†	2,61±0,33*†
(μ²)				

Valores representam média ± EPM. *p<0,05 vs. GN; † p <0,05 vs. GND.

Fração volume de colágeno pulmonar

O aumento da deposição de colágeno nas artérias pulmonares foi significativamente maior nos grupos submetidos à desnervação quando comparado aos

seus controles (GN: $2,6 \pm 0,5$ vs. GND: $8,8 \pm 0,9$ e GH: $26 \pm 1,41$ vs. GHD: $40 \pm 2,24$ %).

Vale ressaltar que a desnervação associada ao aumento da variabilidade da PA induziu um aumento ainda maior na deposição de colágeno no grupo GHD (Figuras 27 e 29).

Figura 27: Percentual de colágeno da artéria pulmonar da região intra acinar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

Figura 28: Fotomicrografia de colágeno das artéria pulmonares da região pré acinar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH), e hipertensodesnervado (GHD).

Figura 29: Fotomicrografia de colágeno das artérias pulmonares da região intra acinar dos grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

A figura abaixo ilustra a presença de infiltrado inflamatório nos grupos normotensos e hipertensos submetidos a DSA na artéria pulmonar pré-acinar na adventícia e na parede do vaso.

GND

GHD

Figura 30: Fotomicrografia das artérias pulmonares intra-acinares mostrando infiltrado inflamatório na adventícia e na parede dos grupos normotenso desnervado (GND), e do hipertenso desnervado (GHD).

4.12 Correlações

A figura abaixo mostra a correlação entre os valores de VE/PC e o LF/HF. Pode-se observar que existe uma importante correlação entre essas duas variáveis ($r = 0,61$ e $p < 0,0009$): quanto maior o valor de VE/PC maior é o LF/HF (Figura 31).

Figura 31: Correlação entre a massa do ventrículo esquerdo sobre o peso corporal do rato (VE/PC) com a modulação autonômica (LF/HF) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

A figura abaixo mostra a correlação entre os valores de PDF do VD e o TAAP. Pode-se observar que existe uma importante correlação entre essas duas variáveis ($r = -0,4408$ e $p < 0,0353$): quanto maior o valor de PDF menor é o TAAP, analisada pela medida direta de função cardíaca e pelo ecocardiograma, respectivamente (Figura 32).

Figura 32: Correlação entre a pressão diastólica final do VD (PDF) com o tempo de aceleração da artéria pulmonar (TAAP) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

A figura abaixo mostra a correlação entre os valores de $-dP/dt$ do VD e o E' do VD. Pode-se observar que existe uma importante correlação entre essas duas variáveis ($r = -0,7026$ e $p < 0,0002$): quanto maior o valor de $-dP/dt$ menor é o E' do VD, analisada pela medida direta de função cardíaca e pelo ecocardiograma, respectivamente (Figura 33).

Figura 33: Correlação entre a derivada de relaxamento do VD ($-dP/dt$) com o índice de velocidade de relaxamento rápido ventricular do tecido do VD ($E' VD$) entre grupos normotenso (GN), normotenso desnervado (GND), hipertenso (GH) e hipertenso desnervado (GHD).

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados observados em animais hipertensos ou normotensos com DSA crônica (10 semanas) foram:

1) Avaliações hemodinâmicas:

- Aumento da variabilidade da PA sem modificar a PA e a FC basais;

2) Avaliações autonômicas:

- Redução da sensibilidade do barorreflexo;
- Aumento da modulação simpática vascular;
- Aumento do balanço autonômico sobre o coração no grupo hipertenso desnervado;

3) Avaliações de função cardíaca:

- Medidas não invasivas: disfunção diastólica e sistólica no grupo normotenso desnervado, e disfunção diastólica no hipertenso desnervado;
- Medidas invasivas: disfunção diastólica;

4) Avaliações morfométricas:

- Aumento da resposta hipertrófica cardíaca ventricular;
- Aumento de fibrose cardíaca ventricular;
- Aumento da expressão de genes marcadores de hipertrofia no VE e no VD;
- Aumento de fibrose nas artérias pulmonares;

5) Hipertensão pulmonar

Embora se reconheça uma redução da sensibilidade do barorreflexo na hipertensão espontânea em ratos, o papel da desnervação completa desses receptores associada ao aumento da VPA sobre as alterações cardiovasculares e arteriais pulmonares, bem como a sua relação com a modulação autonômica do coração e da circulação são pouco esclarecidos. Diante disso, a hipótese testada neste trabalho foi que o prejuízo do barorreflexo, com ou sem aumento da PA, pode induzir o remodelamento cardíaco e das artérias pulmonares por alterar a modulação autonômica comandada pelos barorreceptores arteriais sobre o coração e vasos.

5.1 A influência do barorreflexo nas avaliações hemodinâmicas e autonômicas

A DSA no rato tem sido utilizada desde sua descrição (Krieger, 1964) como uma forma de avaliar o papel do barorreflexo em diferentes situações fisiológicas e patológicas (Osborn e England, 1990; Alexander et al., 1990; Irigoyen et al., 1998 e Miao et al., 2006).

Dados encontrados na literatura confirmam que na fase aguda da DSA ocorre a elevação da PA e o aumento da sua variabilidade (Krieger, 1970, 1984). Já na fase crônica, observa-se a normalização da PA e a manutenção da variabilidade aumentada (Barres et al., 1992, Miao et al., 2006; Piratello et al., 2010). Observou-se também que a hiperatividade simpática detectada na fase aguda se restabelece e volta ao normal na fase crônica. A manutenção do aumento da variabilidade da PA na DSA crônica (Irigoyen et al., 1995) tem confirmado o uso da DSA como modelo de variabilidade da PA.

De acordo com esses achados prévios, neste trabalho observou-se que os grupos desnervados não apresentaram quaisquer mudanças na PA e FC basais e mantiveram a variabilidade da PA aumentada ao longo do período do estudo.

Por outro lado e de acordo com o esperado, no presente estudo detectaram-se valores elevados de PAD, PAS e PAM nos ratos hipertensos comparados aos ratos normotensos. Além disso, os grupos hipertensos submetidos à DSA apresentaram maior variabilidade da PAM, sem, no entanto, modificar os níveis de PA (Piratello et al., 2010). Sabe-se que embora muitos reflexos estejam envolvidos na modulação da atividade simpática, os barorreceptores arteriais são considerados o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento. Os SHR (modelo genético de hipertensão espontânea) apresentam redução da sensibilidade do barorreflexo (Brum, 2000; Berecek, 1991, Moraes-Silva, 2010), pois na hipertensão sustentada, esses mecanorreceptores sofrem adaptações, deslocando sua faixa de funcionamento para um novo nível de PA, que normalmente é acompanhada de redução da sensibilidade dos barorreceptores (Krieger, 1982).

No presente estudo os animais SHR apresentaram uma redução da sensibilidade barorreflexa, enquanto, os animais SHR desnervados apresentaram uma redução adicional desta sensibilidade. Em ambas as situações, entretanto, a variabilidade da PA estava aumentando, confirmando a idéia de que a menor sensibilidade dos barorreceptores é provavelmente o maior determinante do aumento da VPA (Irigoyen e Krieger, 1998, Moraes-Silva, 2010).

Entre as conseqüências cardiovasculares e autonômicas conhecidas da hipertensão, podemos destacar a hipertrofia ventricular, hipertrofia vascular, disfunção cardíaca e hiperatividade simpática (Adams et al., 1989; Ashizawa et al., 1989).

Em relação aos resultados obtidos de VARIP, observamos que a banda de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso, que representa a modulação simpática sobre o coração foi maior nos animais hipertensos em relação aos normotensos, independente da DSA. Esses achados indicam que a hipertensão espontânea independente da DSA determina um aumento da modulação simpática sobre o coração. De forma semelhante, o componente de alta frequência (HF) do IP, que representa a modulação parassimpática sobre o coração, foi menor nos animais hipertensos em relação aos normotensos, porém a DSA associada à hipertensão induziu uma redução adicional do mesmo componente HF. Isto sugere que não apenas a hipertensão, mas também a secção cirúrgica das fibras aferentes dos pressorreceptores são determinantes do controle parassimpático sobre o coração.

É importante salientar que o controle simpático e sua resposta tônica inadequados são afetados não só pela desaferentação dos barorreceptores, mas também pela desaferentação concomitante dos quimiorreceptores presentes na região aórtica e carotídea, característico da desnervação sinoaórtica (Van Vliet, 1999). Estas evidências de disfunção autonômica (aumento do simpático, diminuição do parassimpático e aumento da variabilidade da PA) também podem explicar as alterações estruturais encontradas nos animais hipertensos e nos grupos submetidos à DSA.

5.2 A influência do barorreflexo em variáveis funcionais e estruturais cardiovasculares

O aumento da variabilidade da PA pela interrupção das aferências carótídeas e aórticas, liberando o simpático de sua inibição tônica, parece ser responsável por lesões de órgãos-alvo mais do que a própria PA constantemente elevada (Miao et al., 2006).

A hipertrofia miocárdica é um dos principais mecanismos pelos quais o coração compensa a sobrecarga hemodinâmica característica da hipertensão arterial. A hipertrofia cardíaca eleva os riscos de eventos cardiovasculares pelo aumento da demanda de oxigênio do miocárdio hipertrófico, pela diminuição da reserva coronária, por aumentar a prevalência e severidade das arritmias ventriculares e por promover alterações na contratilidade do miocárdio levando, finalmente, à disfunção cardíaca.

Existem evidências de que a HVE é modesta em ratos normotensos com DSA, com índices de 19% de aumento do VE e que é grave em SHR, com índice de 37% observados com 16 semanas após desnervação (Miao e Su, 2003).

Em contraste ao previamente descrito por Miao e col. (2006), esses dados parecem indicar que a hipertensão, mais do que a labilidade, é um fator crítico para o desenvolvimento da HVE. Alternativamente, a HVE grave pode ser causada pelo sinergismo entre de hipertensão e VPA, uma vez que PA e VPA são correlacionadas positivamente com HVE em SHR (Miao e Su, 2003).

O coração é composto, fundamentalmente, por miócitos, vasos e matriz intersticial de colágeno. Esses três compartimentos, em equilíbrio, contribuem para manutenção da forma e da função cardíaca. Alterações nas composições desses compartimentos refletem no processo de remodelação miocárdica, que esta intimamente associada à disfunção cardíaca. Essa remodelação ocorre em resposta a estímulos

desencadeados por fatores mecânicos, neurais e hormonais sobre o tecido cardíaco (González et al., 2009).

Em condições fisiopatológicas, tais como a hipertensão arterial, o infarto agudo do miocárdio ou a hiperatividade simpática, a hipertrofia cardíaca quando presente constitui um fator de maior morbidade e mortalidade por eventos cardiovasculares (Matssubara et al, 2006).

Na hipertensão arterial, a sobrecarga hemodinâmica estimula a síntese de sarcômeros em paralelo com o aumento da espessura da parede ventricular. O remodelamento cardíaco na HA ocorre por alteração do colágeno decorrente do crescimento de fibroblastos cardíacos (González et al., 2009). Dessa forma, modificações na massa cardíaca são atribuídas às alterações dos cardiomiócitos e fibroblastos.

Nossos resultados confirmam os dados encontrados na literatura, que demonstram HVE em ratos normotensos com DSA e em animais hipertensos. Porém, vale ressaltar que no presente estudo, o grupo SHR com DSA apresentou uma hipertrofia maior quando comparado com os ratos apenas hipertensos, sugerindo que a hipertrofia cardíaca nesses ratos, está também relacionada à VPA e à redução da eficiência do barorreflexo, além da hipertensão.

González e colaboradores (2009) demonstraram que ratos SHR apresentam hipertrofia cardíaca pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e da concentração de colágeno.

Esses dados corroboram com os nossos achados que demonstram HVE, aumento no diâmetro dos cardiomiócitos no VE e da fração de volume de colágeno cardíaco nos ratos SHR. Além disso, os ratos hipertensos com DSA apresentaram padrão de hipertrofia mais acentuado com maior síntese de miócitos, e de colágeno. Sugerindo que

não apenas a hipertensão, mas também à VPA e a redução da eficiência do barorreflexo são determinantes na remodelação cardíaca. Neste sentido, evidências dão suporte de que a manutenção dos níveis elevados da PA e /ou da variabilidade da PA são mecanismos que resultam em hipertrofia cardíaca.

A compensação das sobrecargas hemodinâmicas pela hipertrofia cardíaca pode ser vista como uma alça de retro-alimentação iniciada pelo aumento da tensão na parede das câmaras cardíacas, provocando aumento da síntese proteica, que por sua vez reduz a tensão provocada pela sobrecarga (Franchini, 2001). As sobrecargas de pressão produzem sinais mecânicos que provocam a replicação dos sarcômeros em paralelo, o que leva a um aumento da espessura e à consequente redução na tensão da parede da câmara. A persistência do estímulo mecânico por resposta funcional ou fenotípica inapropriada (sobrecarga hemodinâmica e fatores neuro humorais) dos cardiomiócitos leva à dilatação progressiva do ventrículo esquerdo e à alterações na estrutura do miocárdio, onde coexistem a hipertrofia e a degeneração dos cardiomiócitos (Braunwald e Bristow, 2000). De fato, parece que apenas o estiramento, mesmo na ausência de fatores humorais, pode ser o elemento responsável pelo desencadeamento da hipertrofia. Yamazaki e colaboradores estudando cardiomiócitos em cultura, que foram submetidos à diferentes graus de estiramento mecânico. Sugerindo que o estresse mecânico por estiramento pode induzir a resposta hipertrófica dos cardiomiócitos mesmo na ausência da angiotensina II, como fator neuro humoral (Yamazaki et al., 1999).

A caracterização não invasiva dos diferentes padrões geométricos e funcionais do VE, observados na hipertrofia do miocárdio, foi realizada por meio do ecocardiograma. A associação dos estudos ecocardiográficos, celulares e moleculares tem permitido o melhor entendimento do processo patológico da hipertrofia do VE em ratos (Kai et al., 1996).

Dados obtidos no presente estudo com a avaliação ecocardiográfica identificaram aumento do tamanho da cavidade do VE, do septo interventricular, da parede posterior do VE, bem como da massa do VE corrigido pelo peso nos ratos hipertensos quando comparados aos normotensos. Isso evidenciou o já conhecido papel da hipertensão no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Além disso, observou-se que essas alterações estavam acentuadas nos ratos hipertensos submetidos à DSA. Isto sugere que o aumento da VPA pode contribuir para a hipertrofia ventricular esquerda, já que não havia diferença na PAM dos ratos hipertensos com ou sem desnervação, enquanto a VPA foi maior nos hipertensos SAD. Dessa forma, nossos achados demonstram que a hipertrofia foi mais acentuada quando a hipertensão foi associada à DSA (Friberg et al., 1982; Miao et al., 2006).

Kokubo e col. (2005) demonstraram que ratos SHR apresentam hipertrofia cardíaca a partir de 4 semanas de idade e disfunção sistólica e diastólica após 2 a 3 meses de vida. Neste mesmo estudo, os autores verificaram inicialmente uma hipertrofia excêntrica com 4 semanas de idade associada com um aumento da massa do VE sobre o peso corporal e uma espessura relativa de parede normal. Após 6 semanas de idade, a espessura relativa da parede de ratos SHR aumenta progressivamente levando a uma hipertrofia concêntrica do VE. Essas alterações ocorrem em decorrência da hipertensão e sobrecarga de volume.

No presente estudo, observamos alterações morfométricas no tamanho da cavidade do VE na diástole em ratos SHR com 18 semanas; esses dados corroboram com o estudo realizado por Kokubo e colaboradores (2005), que também evidenciaram um aumento progressivo da cavidade do VE na diástole em ratos espontaneamente hipertensos com 16 a 20 semanas, comparados a ratos normotensos da mesma idade.

Esses achados podem estar relacionados com variações da espessura da parede e fibrose já esperados em ratos SHR (Kokubo et al., 2005).

A hipertrofia do ventrículo direito no modelo de DSA foi primeiramente demonstrada por Van Vliet (1999), que utilizou ratos Long-Evans com 4 semanas de DSA relatando que a hipertrofia do ventrículo direito esta presente como consequência da desnervação do quimiorreflexo e não do barorreflexo, já que o corpo carotídeo contém um grande número de quimiorreceptores.

Além disso, Miao e colaboradores também demonstraram em seus estudos a presença de hipertrofia ventricular direita em animais Wistar-kyoto com 32 semanas após a DSA. Isso enfatiza a importância entre o tempo de DSA com o aumento da HVD (Miao et al., 2004).

Esses dados corroboram com os nossos achados que demonstram HVD, aumento da fração de volume de colágeno cardíaco no VD nos ratos normotensos submetidos há 10 semanas de DSA.

Vale ressaltar que, diferentemente dos demais trabalhos encontrados na literatura, os ratos hipertensos com DSA apresentaram padrão de hipertrofia ventricular direita mais grave com maior deposição de colágeno, e com maiores valores de volume do ventrículo direito na diástole e na sístole evidenciados pelo ecocardiograma.

Isto sugere que não apenas a hipertensão, mas também a VPA e a redução da eficiência do barorreflexo são determinantes na remodelação cardíaca nesses animais.

É possível que o aumento demasiado da hipertrofia ventricular direita no modelo de DSA esteja presente devido à desnervação concomitante dos quimiorreceptores, havendo inclusive repercussões sobre a circulação pulmonar, o que aumentaria o estímulo para a hipertrofia da câmara direita do coração (Van Vliet, 1999).

A complacência da parede ventricular depende da quantidade, da distribuição e da composição do colágeno que forma o estroma conjuntivo. Considerando que as fibras colágenas de maior rigidez podem aumentar em determinados tipos de hipertrofia, essa condição pode provocar deficiência no processo de relaxamento do miocárdio, e como consequência, a insuficiência diastólica.

No coração são encontrados os colágenos dos tipos I, III, V, VI. O colágeno tipo I, que constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, é o mais rígido de todos, sendo, portanto o responsável pela rigidez cardíaca. O colágeno tipo III forma agregados mais finos do que do tipo I e constitui cerca de 10% de colágeno cardíaco (Miel e Vassalo, 2001).

Corroborando com os dados de fração de colágeno analisado pela histologia (*picro sirius*), a expressão gênica do colágeno tipo I e do tipo III tanto no VE quanto no VD foram maiores nos grupos submetidos à DSA.

A disfunção diastólica do VE é observada tanto na hipertensão (Cingolani et al., 2003) quanto na desnervação (Rosa, 2008).

Dados obtidos no presente estudo com a avaliação de medidas indiretas de função cardíaca, avaliada pelo ecocardiograma identificaram a presença de disfunção diastólica do VE evidenciada pelo aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico e pela maior velocidade de fluxo de enchimento rápido ventricular nos animais normotensos submetidos à DSA (Mostarada et al., 2011). Além disso, a presença de disfunção sistólica do VE foi também evidenciada pela diminuição da velocidade de encurtamento circunferencial, pela diminuição da fração de ejeção, e pela diminuição do débito cardíaco nos animais normotensos submetidos à DSA. Em hipertensos, embora não tenham sido observadas diferenças na VEC e na FEj, a DSA induziu uma diminuição do débito cardíaco.

Em paralelo a isso, medidas de função cardíaca direta avaliada pela cateterização ventricular mostraram uma maior pressão diastólica final tanto no VE quanto no VD nos animais normotensos e hipertensos submetidos à DSA.

A incapacidade de esvaziamento total da câmara cardíaca leva ao aumento do volume e de pressão diastólica final, além da queda do volume sistólico, levando a redução do débito cardíaco. Além disso, mudanças importantes na estrutura cardíaca poderiam estar influenciando nos valores de pressão diastólica final. Por exemplo, alterações na massa cardíaca, assim como a rigidez e complacência do tecido cardíaco alteram diretamente a capacidade volumétrica ventricular (Franchini, 2001).

O processo de remodelação ventricular é influenciado por diversos estímulos. Fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica pressórica ou volumétrica), bioquímicos (Angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada) podem tanto desencadear como regular a remodelação miocárdica. (Franchini, 2001).

Independentemente do estímulo da remodelação cardíaca, nas hipertrofias patológicas que são secundárias a um desequilíbrio hemodinâmico, ocorre a reprogramação da expressão gênica nos miócitos. Uma das características mais importantes desse processo é a modificação do padrão de expressão de diversas proteínas, com re-expressão de genes do período fetal que são mais atuantes durante a vida intra embrionária, tais como o peptídio natriurético atrial, a enzima conversora da angiotensina e as isoformas fetais das proteínas contrateis, como por exemplo a alfa actina esquelética. (Vikstrom et al., 1998; Bovill et al., 2008; Miel e Vassalo, 2001). Aceita-se, portanto, que a expressão genética fetal seja tanto um marcador como um dos mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco.

Kaganovsky et al. (2001) demonstraram que ratos SHR apresentam uma maior presença do ANF nas células que tinham um aumento no diâmetro dos miócitos. No presente estudo os animais normotensos com DSA apresentaram uma maior expressão do ANF e da alfa actina esquelética tanto no ventrículo direito como no ventrículo esquerdo. Os animais SHR apresentaram aumento da expressão desses genes tanto no VE como no VD. Entretanto, apenas a alfa actina esquelética no VD estava mais expressa no grupo SHR submetido à DSA.

Isto sugere que a disfunção barorreflexa pode influenciar o curso temporal da hipertrofia cardíaca nos animais normotensos. Os possíveis mecanismos dessas alterações são a VPA e o aumento do balanço simpato/vagal. Porém, não observamos diferenças do ANF e da alfa actina esquelética entre os ratos hipertensos e ratos hipertensos com DSA. Uma possível explicação para tal achado poderia ser que o aumento expressivo do ANF observado no ventrículo do animal apenas hipertenso tenha já atingido um valor máximo, de tal forma a não responder mais a um novo estímulo. Nesse caso, a DSA não teria influenciado a expressão dos genes entre os ratos SHR e SHR com DSA. Note-se que, de fato, a diferença entre o animal controle intacto e o hipertenso também intacto é de cerca de 25 vezes da expressão do ANF no VE; 6 vezes da expressão do ANF no VD, e 6 vezes da expressão da alfa actina esquelética no VE.

5.3 A influência do barorreflexo na hipertensão pulmonar e no remodelamento das artérias pulmonares

A Hipertensão Arterial Pulmonar é caracterizada pelo aumento da resistência dos vasos pulmonares, aumento na pressão arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo

direito, prejudicando as trocas gasosas alveolares e a função cardíaca. Além disso, a hipertensão pulmonar também é caracterizada pelo remodelamento vascular associado com a elevação da pressão sistólica do VD e com a elevação da resistência vascular pulmonar, os quais conduzem de forma progressiva para a falência ventricular direita e morte súbita (Thibault et al., 2010)

No presente estudo a presença de HAP foi indicada através do uso de métodos não invasivos (ecocardiográficos) avaliada pela aceleração do fluxo da artéria pulmonar e pela pressão média estimada da artéria pulmonar. Com essas medidas, a DSA promoveu hipertensão pulmonar nos ratos normotensos e hipertensos. Além disso, observou-se que essas alterações estavam acentuadas nos ratos hipertensos submetidos à DSA. Isto sugere, que o aumento da VPA pode contribuir para a hipertensão pulmonar, mesmo que os níveis de PAM não se alterem.

Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a pressão diastólica do ventrículo direito e o tempo de aceleração do fluxo da artéria pulmonar, mostrando que quanto maior a disfunção diastólica do ventrículo direito maior é a HAP.

O remodelamento patológico dos vasos pulmonares ocorre frente a estímulos injuriantes de diferentes naturezas produzindo substâncias como citocinas e fatores de crescimento que levam às alterações nas células musculares lisas da túnica média, resultando em alterações na espessura dessa camada. Além da hipertrofia da camada média, há um aumento na deposição de componentes da matriz extracelular como colágeno e elastina (Egito et al., 2003). O remodelamento da artéria pulmonar tem sido considerado umas das principais causas do aumento da pressão da artéria pulmonar (Xie et al., 2010).

Embora no presente estudo os animais submetidos à DSA não tenham apresentado hipertrofia da camada média das artérias pulmonares e redução do lúmen

vascular, os mesmos apresentaram uma maior deposição de colágeno na camada média das artérias pulmonares tornando o vaso mais resistente. Além disso, observou-se de forma qualitativa, não mensurada, que houve um espessamento da adventícia. As consequências dessas alterações não são completamente esclarecidas, mas morfológicamente o aumento da adventícia seria ocasionado pelo aumento da deposição de colágeno e de fibras elásticas com o intuito de absorver a maior pressão do leito vascular (Stenmark, 1987).

A inflamação tem um papel importante no desenvolvimento e na manutenção de lesões morfológicas das artérias pulmonares na HAP evidenciada pela presença de infiltrado inflamatório na adventícia e na parede das artérias pulmonares (Perros., 2011; Dahal et al., 2011). De fato, foi observada nos ratos submetidos à DSA uma maior presença de infiltrado inflamatório da adventícia e na parede das artérias pulmonares.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível comparar os efeitos da desnervação sinoaórtica, como modelo de disfunção barorreflexa, em animais normotensos e hipertensos. O objetivo dessa proposta foi quantificar as alterações hemodinâmicas e funcionais, autonômicas e estruturais, bem como moleculares induzidas por essa disfunção. Essa abordagem permitiu obter evidências de que isoladamente ou em associação com a hipertensão, essa disfunção poderia aumentar o risco cardiovascular por induzir lesões cardíacas e/ou vasculares que resultariam em prejuízos funcionais.

Observou-se que em muitas avaliações a desnervação isolada levou a prejuízos semelhantes aos observados na hipertensão também isolada, como nas medidas de espessura relativa da parede do VE, do débito cardíaco, da pressão diastólica final do VE, da variabilidade da PA, da pressão arterial estimada da artéria pulmonar e do tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar, bem como expressão gênica da alfa actina esquelética.

Essas alterações nos permitem inferir que não apenas a hipertensão, mas a disfunção barorreflexa induzida pela desnervação sinoaórtica por alterar a variabilidade da PA e reduzir a sensibilidade do barorreflexo foi capaz de induzir alterações moleculares, estruturais e funcionais relacionada à lesão de órgão alvo e aumento do risco cardiovascular.

Adicionalmente, foi possível observar que a hipertensão por si só é capaz de produzir alterações da variabilidade da PA e da FC e lesões de coração e vasos, quando associada com a disfunção barorreflexa extensa induzida pela DSA induziu alterações adicionais na estrutura e função cardíaca e vascular, bem como alterações do ventrículo

direito, das artérias pulmonares levando à exacerbação do quadro de hipertensão pulmonar.

Dessa forma, podemos concluir que:

A ausência do controle reflexo da circulação exercido predominantemente pelos barorreceptores arteriais, independente da presença de hipertensão sustentada, induz prejuízos funcionais e estruturais que em grande parte estão acentuados pela presença da hipertensão quando associada à desaferentação dos barorreceptores. Esses prejuízos devem estar associados à função barorreflexa prejudicada pela DSA, sem modificações na PA, à variabilidade da PA e pela atividade simpática periférica não mais modulada pela ação homeostática do barorreflexo. Essas alterações foram capazes de repercutir em importantes ajustes na estrutura cardíaca caracterizados pela hipertrofia do VE e do VD, bem como na indução da hipertensão pulmonar.

Estas mudanças sugerem fortemente que a disfunção barorreflexa isolada pode modular lesões de tecidos alvo.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, MA; BOBIK, A; KORNER, PI. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic Hypertension: relation to sympathetic function. *Hypertension*.1989.(14)191-202,
- ALEXANDER N, VELASQUEZ MT, DECUIR M, MARONDE RF. Indices of sympathetic activity in the sinoaortic-denervated hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1980. 238(4):H521-6.
- ASHIZAWA N, SETO S, KITANO K, TOYAMA K, SASAKI H, KODAMA K, HOSODA Y, SHIMAOKA K, SHIBATA Y, HASHIBA K. Effects of blood pressure changes on development and regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy: a 26 year longitudinal study. *J Am Coll Cardiol*. 1989. (1):165-72.
- BERECEK KH, ROBERTSON JD, THORSTAD MH. Central administration of a specific angiotensin II receptor antagonist on baroreflex function in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension*.1991. (4): 365-71.
- BARRES, C; LEWIS, SJ; JACOB, HJ; BRODY, MJ. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol*. 1992. (263) R639-46.
- BING, OHL; BROOKS, WW; ROBINSON, KG; SLAWSKY, MT; HAYES, JA; LITWIN, SE; SEM, S; CONRAD, CH. The spontaneously hypertensive rat as a

model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.*1995.(27)383-396.

BOVILL E, WESTABY S, REJI S, SAYEED R, CRISP A, SHAW T. Induction by left ventricular overload and left ventricular failure of the human Jumonji gene (JARID2) encoding a protein that regulates transcription and reexpression of a protective fetal program. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008.136(3):709-16. Epub 2008 Jun 9.

BRAUNWALD E, BRISTOW MR. CONGESTIVE HEART FAILURE: fifty years of progress. *Circulation.* 2000. (20 Suppl 4):IV14-23.

BRUM, PC; SILVA, GJJ; MOREIRA, ED; IDA, F; NEGRÃO, CE; KRIEGER, EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension.*2000. (63)1018-1022.

CINGOLANI OH, YANG XP, CAVASIN MA, CARRETERO OA. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2003.41(2):249-54.

CHIEN, K.R.; KNOWLTON, K.U.; ZHU, H. et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. 1991. *FASEB J*, v. 5, p. 3037-3046.

CICOGNA, AC; ROBINSON, KG; CONRAD, CH; SQUIRE, R; OKOSHI, MP; BING, OH. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na

disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 1997. 69 (6)381-384.

III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. (fev.12-15) Campos do Jordão, SP, 38pp, 1998.

DAHAL BK, KOSANOVIC D, KAULEN C, CORNITESCU T, SAVAI R, HOFFMANN J, REISS I, GHOFrani HA, WEISSMANN N, KUEBLER WM, SEEGER W, GRIMMINGER F, SCHERMULY RT. Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res.* 2011.12(1):60.

DE ANGELIS, KLD; OLIVEIRA, AR; WERNER, A; BOCK, P; BELLÓ-KLEIN, A; IRIGOYEN, M.C. Exercise training in aging: hemodynamics, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension.*1997.30(3) II: 767-771.

DE ANGELIS, KLD; GADONSKI, G; FANG, J; DALL'AGO, P; ALBUQUERQUE, VL; PEIXOTO, LRA; FERNANDES, TG; IRIGOYEN, MC. Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension*, 34 (2):768-772, 1999.

DEQUATTRO V, FENG M. The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. *J Hum Hypertens.* 2002. (16)64-9.

DIAS D, VIANA P, DE M, FAZAN R JR, RUSCONE TG, PORTA A, MALLIANI A, SALGADO HC, MONTANO N. Intravenous amiodarone modifies autonomic

balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Auton Neurosci.* 2002;95:88-96.

DOGGRELL SA, BROWN L Rat models of hypertensive, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1): 89-105.

EGITO ES, AIELLO VD, BOSISIO IB, LICHTENFELS AJ, HORTA AL, SALDIVA PH, CAPELOZZI VL. Vascular remodeling process in reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *Pathol Res Pract.* 2003. 199(8):521-32.

FLORAS JS, HASSAN MO, JONES JV, OSIKOWSKA BA, SEVER PS, SLEIGHT P. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *J Hypertens* 1988; 6:525-35.

FRANCHINI KG. Hipertrofia cardíaca: mecanismos celulares. *Rev brasileira hipertensão.* 2001. 8:125-42.

FRANCHINI, KG AND KRIEGER EM. Carotid chemoreceptor influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol.* 1992; 262 R677-83.

FRIBERG, P; HALLBACK-NORDLANDER, M; KARLSSON, B; LJUNG, B. Circadian rhythm of arterial blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive control rats. In: Rascher W, Clugh D, Ganted D (eds). *Proceedings of the*

4th International Symposium on Rats with Spontaneous hypertension and Related Studies, heidelberg, Schattauer, Stuttgart.1982.361-3,

GONZÁLEZ A, LÓPEZ B, RAVASSA S, BEAUMONT J, ARIAS T, HERMIDA N, ZUDAIRE A, DíEZ J. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009. (3):509-18.

GERRITSEN J, DEKKER JM, TEN VOORDE BJ, KOSTENSE PJ, HEINE RJ, BOUTER LM, HEETHAAR RM, STEHOUWER CD. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn study. *Diabetes Care*. 2001. 24(10):1793-8.

IRIGOYEN MC, CONSOLIM-COLOMBO FM, KRIEGER EM. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev Bras Hipertensão*. 2001. (8)55-62.

IRIGOYEN, MC; KRIEGER, EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1998. (31)1213-1220.

IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; IDA, F.; PIRES, M.; CESTARI, I.A.; KRIEGER, E.M. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*. 1995. (6)1111-6.

IZUMO, S.; NADAL-GINRD, B.E MAHDAVI, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 1988. (85)339-343.

JONES JE, MENDES L, RUDD MA, RUSSO G, LOSCALZO J, ZHANG YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2002. 283(1):H364-71.

JONES JV, FLORAS JS: Baroreflex sensitivity changes during the development of Goldblatt two-kidney one-clip hypertension in rats. *Clin Sci* 1980; 59: 347-353.

JUST A, WAGNER CD, EHMKE H, KIRCHHEIM HR, PERSSON PB. On the origin of low-frequency blood pressure variability in the conscious dog. *Physiol.* 1995. 15;489.215-23.

KAGANOVSKY E, BELKIN V, BARHUM Y, SCHAPER J, SCHAPER W, KESSLER-ICEKSON G. Occurance and distribution of atrial natriuretic peptide-containing cells in the left ventricle of hypertensive rats. *Cell tissue.* 2001.303:57-67.

KAI H, KUDO H, TAKAYAMA N, YASUOKA S, KAJIMOTO H, IMAIZUMI T. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling-role of cardiac inflammation. *Circ J.* 2009. (12):2198-203.

KAPLAN NM. Primary Hypertension: Pathogenesis. In: Clinical Hypertension, Kaplan NM. Baltimore: Williams e Wilkins, 1998. 41-99.

KOKUBO M, UEMURA A, MATSUBARA T, MUROHARA T. Noninvasive Evaluation of the time Course of Change in Cardiac Function in Spontaneously Hypertensive Rats by Echocardiography. *Hypertension*. 2005.(28)601-8.

KOSKENVUO JW, MIRSKY R, ZHANG Y, ANGELI FS, JAHN S, ALASTALO TP, SCHILLER NB, BOYLE AJ, CHATTERJEE K, DE MARCO T, YEGHIAZARIANS YA. Comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010 Jun;26(5):509-18.

KRIEGER, J.K. Hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 1995.(5)n.3 mai/jun.

KRIEGER, E.M; MICHELINI, L.C. Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. *Rev. Cardiol. Estado de São Paulo*. 1992.(2) n. 4, p.9-17.

KRIEGER, E.M. Neurogenic Hypertension in the rat, capítulo 19. In: Handbook of Hypertension, Vol. 4: *Experimental and Genetic models of Hypertension*, W de Jong Ed. Elsevier Science. 1984.

KRIEGER EM, SALGADO HC, MICHELINI LC. Resetting of the baroreceptors. *Int Rev Physiol* 1982; 26:119-46.

KRIEGER, E.M. The acute phase of neurogenic hypertension in the rat. *Experientia*. 1970. (26)n.6,p.628-9.

KRIEGER, E.M. Neurogenic Hypertension in the rat. *Circ Res*. 1964.(15) p. 511-21.

KRIEGER, EM; MARSEILLAN, RF. Aortic depressor fibers in the rat: and electrophysiological study. *Am J Physiol*. 1963. 205:771-774.

LA ROVERE, MT., BIGGER JR, JT., MARCUS FL., MORTARA A., SCHWARTZ, PJ., Baroreflex Sensitivity and Heart-Rate Variability in Prediction of Total Cardiac Mortality After Myocardial Infarction. *The Lancet*. 1998. (351)478-484.

LO M, JULIEN C, MICHEL JB, VINCENT M, CERUTTI C, GOMES-SANCHEZ CE, SASSARD J: Antirenin immunization versus angiotensin converting enzyme inhibition in rats. *Hypertension* 1990.(16)80-88.

LOPES HF, SILVA HB, SOARES JA, FILHO B, CONSOLIM-COLOMBO FM, GIORGI DM, KRIEGER EM. Lipid metabolism alterations in normotensive subjects with positive family history of hypertension. *Hypertension* 1997. (30)629-31.

MANCIA, G; DI RIENZO, M; PARATI, G; GRASSI, G. Sympathetic activity, blood pressure variability and end organ damage in hypertension. *J Hum Hypertens*. 1997. (1)S3-S8.

MANCIA, G; FERRARI, A; Gregorini, L; Parati, G; Pomidossi, G; Bertinieri, G; Grassi, G; di Rienzo, M; Pedotti, A; Zanchetti, A. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ Res.* 1983. (53) 96-104.

MARTINKA P, FIELITZ J, PATZAK A, REGITZ-ZAGROSEK V, PERSSON PB, STAUSS HM. Mechanisms of blood pressure variability-induced cardiac hypertrophy and dysfunction in mice with impaired baroreflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005. (3):R767-76.

MIAO CY, XIE HH, ZHAN LS, SU DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens.* 2006.24(6):1125-35.

MIAO CY, CAI GJ., ET AL. Greater hypertrophy in right than left ventricles is associated with pulmonary vasculopathy insinoaortic-denervated wistar-kyoto rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2004.31:450-455.

MIAO, C. Y., W. J. YUAN, ET AL. Comparative study of sinoaortic denervated rats and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2003. (16)585-91.

MIAO CY, SU DF: The importance of blood pressure variability in rat aortic and left ventriculat hypertrophy produced by sinoaortic denervation *J Hypertes.* 2002.20: 1865-1872.

MICHELINI L. Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: *Fisiologia*, Ayres MM, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. pp. 473-88.

MIEL JG, VASSALO DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev brasileira de hipertensão*. 2001;8:63-75.

MOSTARDA C, MORAES-SILVA IC, MOREIRA ED, MEDEIROS A, PIRATELLO A, CONSOLIM-COLOMBO FM, CALDINI EG, BRUM PC, KRIEGER EM, IRIGOYEN MC. Baroreflex sensitivity is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. *Journal of cardiac failure*. 25 April 2011.

MOSTARDA C, RODRIGUES B, VANE M, MOREIRA ED, ROSA KT, MORAES-SILVA IC, LACCHINI S, CASARINI DE, DE ANGELIS K, IRIGOYEN MC. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;4:447-52.

MORAES-SILVA IC, DE LA FUENTE RN, MOSTARDA C, ROSA K, FLUES K, DAMACENO-RODRIGUES NR, CALDINI EG, DE ANGELIS K, KRIEGER EM, IRIGOYEN MC. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010. 37(3):e114-20.

NADAL-GINARD, B. e MAHDAVI, V. Molecular basis of cardiac performance: plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest*. 1989. (84)1693-700.

NORMAN RA JR, COLEMAN TG, DENT AC. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension*. 1981.(1):119-25.

OSBORN JW, ENGLAND SK. Normalization of arterial pressure after barodenervation: role of pressure natriureses. *Am J Physiol*.1990.259 :R1172-80.

OU LC, SMITH RP. Probable strain differences of rats in susceptibilities and cardiopulmonary responses to chronic hypoxia. *Respiratory Physiology*. 1983. (3):367-377.

PAGANI M, LOMBARDI F, GUZZETI S, RIMOLDI O, FURLAN R, PIZZINELLI P, SANDRONE G, Malfatto G, DELL'ORTO S, PICCALUGA E, TURRIEL M, BASELLI G, CERUTT S, MALLIANI A. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res*.1986.59:178-193.

PARKER, T.G. e SCHNEIDER, M.D. Growth factors, protooncogenes, and plasticity of the cardiac genome. *Ann. Rev. Physiol*.1991. (53)179-200.

PAULL JR, BUNTING MW, WIDDOP RE. Role of the brain renin-angiotensin system in the maintenance of blood pressure in conscious spontaneously hypertensive and sinoaortic baroreceptor-denervated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997.24(9-10):667-72.

PERROS F, MONTANI D, DORFMÜLLER P, HUERTAS A, CHAUMAIS MC, COHEN-KAMINSKY S, HUMBERT M. Novel immunopathological approaches to pulmonary arterial hypertension. *Presse Med.* 2011;1:1S3-13.

PIRATELLO AC, MORAES-SILVA I, PAULINI J, SOUZA PR, SIRVENTE R, SALEMI V, FLUES K, MOREIRA ED, MOSTARDA C, CUNHA T, CASARINI DE, IRIGOYEN MC. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(12):1345-50.

ROSA KT. Importância do barorreflexo nas alterações estruturais e funcionais cardíacas induzidas pela hipertensão experimental em ratos: avaliações hemodinâmicas e ecocardiográficas. São paulo (Tese), Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

SAHN DJ, DEMARIA A, KISSLO J, WEYMAN A . Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*.1978. (6):1072-83.

SCHUNKERT, H; DZAU, VJ; TANG, SS; HIRSH, AT; APSTEIN, CS; LORELL, BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *Journal of Clinical Investigations*.1990.(86) 1913-1920.

SEALS, DR; HAGBERG, JM; SPINA, RJ, et al. Enhanced left ventricular performance in endurance trained older man. *Circulation*.1994.(89)198.

SHARMA, RV; TOMANEK, RJ; BHALLA, RC. Effect of swimming training on cardiac function and myosin ATPase activity in SHR. *Journal of Applied Physiology*.1985. (3)758-765.

SOARES PP, DA NÓBREGA AC, USHIZIMA MR, IRIGOYEN MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci*. 2004.113(1-2):24-31.

SU DF, CHEN L, KONG XB, CHENG Y. Determination of arterial baroreflex-blood pressure control in conscious rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2002. 23:103-9.

SU DF, MIAO CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001. (28)709-15.

STENMARK KR, FASULES J, HYDE DM, VOELKEL NF, HENSON J, TUCKER A, WILSON H, REEVES JT. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4300 m. *J Appl Physiol*.1987. 62:821-830.

TANAKA Y, BERNSTEIN ML, MECHAM RP, PATTERSON GA, COOPER JD, BOTNEY MD. Site-specific responses to monocrotaline-induced vascular injury: evidence for two distinct mechanisms of remodeling. *American Journal of Respiratory and Cellular Molecular Biology*. 1996; 15(3):390-397.

THIBAUT HB, KURTZ B, RAHER MJ, SHAIK RS, WAXMAN A, DERUMEAUX G, HALPERN EF, BLOCH KD, SCHERRER-CROSBIE M. Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010. 3(2):157-63.

VAN VLIET BN, CHAFE LL, MONTANI JP. Contribution of baroreceptors and chemoreceptors to ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation in rats. *Journal of Physiology*. 1999. 516:885-895.

VAN VLIET, B.N.; HU, L.; SCOTT, T.; CHAFE, L.; MONTANI, J-P. Cardiac hypertrophy and telemetered blood pressure 6 wk after baroreceptor denervation in normotensive rats. *Am J Physiol*. 1996. (271)R1759-69.

VIKSTROM KL, BOHLMeyer T, FACTOR SM, LEINWAND L A. Hypertrophy, Pathology, and Molecular Markers of Cardiac Pathogenesis. *Circulation Research*. 1998. 82:773-778.

YAMAZAKI, T.; KOMURO, I.; SHIOJIMA, I.; YAZAKI, Y. The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Ann N Y Acad Sci*. 1999.(30)38-48,
Xie L, Lin P, Xie H, Xu C. Effects of atorvastatin and losartan on monocrotaline-induced pulmonary artery remodeling in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2010.32(8):547-54.