Pamella Ramona Moraes de Souza

**Influência da desnervação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores
nas variáveis hemodinâmicas e morfofuncionais dos tecidos cardíaco e
músculo-esquelético em ratos espontaneamente hipertensos**

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. Maria Claudia Costa
Irigoyen

São Paulo

2013

Pamella Ramona Moraes de Souza

**Influência da desnervação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores
nas variáveis hemodinâmicas e morfofuncionais dos tecidos cardíaco e
músculo-esquelético em ratos espontaneamente hipertensos**

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. Maria Claudia Costa
Irigoyen

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Pamella Ramona Moraes de

Influência da desnervação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores nas variáveis hemodinâmicas e morfofuncionais dos tecidos cardíaco e músculo-esquelético em ratos espontaneamente hipertensos/ Pamella Ramona Moraes de Souza. --São Paulo, 2013.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen.

Descritores: 1.Hipertensão/fisiopatologia 2.Barorreflexo 3.Células quimiorreceptoras/fisiologia 4.Denervação autônoma/métodos 5.Sistema nervoso autônomo 6.Ratos Wistar 7.Ratos endogâmicos SHR 8.Hipertrofia ventricular esquerda/patologia 9.Músculo esquelético 10.Pressão sanguínea/fisiologia

USP/FM/DBD-442/13

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria José e Paulo Araújo, que me incentivaram e me compreenderam em um momento de decisão. Grandes investidores dos meus sonhos, abdicando dos seus para que eu pudesse realizar os meus, e, sobretudo por compreenderem minha ausência durante estes anos, a saudade foi meu maior obstáculo. Agradeço pelo amor incondicional, apoio, confiança e por me mostrarem que determinação e coragem são necessárias para ultrapassar barreiras, e principalmente, que nunca devemos perder as esperanças na vida, no fim tudo dar certo! Obrigada pela orientação em todas as minhas escolhas, espero que um dia eu possa recompensá-los pelo que fizeram e fazem por mim. Sem vocês, não teria forças para lutar e alcançar mais esta conquista!

À minha irmã e sobrinho, Paula e Guilherme, pelo amor, apoio, respeito e por me proporcionarem momentos de felicidades durante nossos convívios.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Acima de tudo e de todos agradeço a Deus, que em sua onipresença regou minha vida, dando-me amparo, equilíbrio nos momentos em que mais precisei, pelas bênçãos concedidas em minha vida.

Ao meu grande e verdadeiro amor Wilson Max, por sua extensa paciência, compreensão, cuidado, incentivo, por estar sempre disposto a me ajudar em qualquer situação. Ter o seu amor e apoio me conforta para continuar nessa árdua caminhada. Obrigada por me apresentar a pesquisa e existir em minha vida!

A minha orientadora profa Dra Maria Claudia Irigoyen, um exemplo de dedicação, postura ética e grande incentivadora da pesquisa, meu respeito e admiração. Pela sua disponibilidade, mesmo em período de férias, que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Saliento o apoio incondicional prestado, oportunidades, exigência científica e ensinamentos! Ser sua aluna e saber que fiz e faço parte dessa família me deixa extremamente orgulhosa!

À profa Kátia De Angelis, minha segunda orientadora e exemplo de profissional, pela sua atenção, paciência, simplicidade e segurança nas suas sugestões. Muito obrigada pela atenção e pelas horas dedicadas às correções deste trabalho. Sentir-se apoiada em momentos difíceis facilitou minha caminhada. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

O meu reconhecimento e gratidão àqueles que contribuíram direto ou indiretamente na elaboração deste trabalho:

Ao meu grande professor, pai científico e amigo Hermógenes David de Oliveira, exemplo de homem, professor e pesquisador, que confiou e acreditou no meu trabalho durante a iniciação científica e que despertou minha paixão pela pesquisa. Muito obrigada pela paciência, rigor científico e amizade ao longo destes anos.

A minha amiga Marcia Kiyomi Koike, que em poucos dias acreditou, confiou e me deu oportunidade de voltar à SP e me apresentar a profa. Maria Claudia. Obrigada pelas oportunidades, conselhos, apoio, motivação e por entender as minhas limitações e estar sempre me ajudando a superá-las.

Ao meu irmão de coração e amigo José Rodrigues de Carvalho Jr, pelo apoio no momento em que mais precisei, pelo carinho, amizade sincera e pelos momentos diários de descontração. Sou eternamente grata por tudo que fez e faz por mim.

À profa. Edilamar Menezes de Oliveira, pela colaboração e por disponibilizar seu laboratório para as análises de expressão gênica. Agradeço também a Glorinha pela paciência e comprometimento na realização das análises.

Ao meu querido Edson Dias Moreira, pela amizade, risadas, desabafos e comprometimento com este trabalho, meu respeito e gratidão.

As minhas irmãs e grandes amigas, Reny Cavalcante e Andrea Mihaliuc, pelos conselhos, incentivos, respeito, carinho e cuidado. Presente de Deus, torço muito por vocês!

Aos amigos que ganhei na convivência diária de laboratório, Fabiana Guimarães, Gê, Aline Piratello, Karin Flues, Raquelzinha, Zaira, Bel, João e Maikon. Obrigada pela ajuda neste trabalho, carinho e momentos de descontração.

A todos os membros do laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração, Emerson, Oscar, Dudu, Cavinato, Cristiano, Jacqueline, Ivana, Leandro, Fernando, Janaína, Michele, Paula, Dani e Luciana, em especial a Kátia Scapini pela ajuda final. Conviver com vocês é um aprendizado diário. Obrigada pela ajuda!

Aos meus queridos EPMistas e colaboradores da UNIFESP, profa Hanna Karen, Murilo, Sarah, Helton e Marcos.

Ao meu avô de coração, presente de SP, Pedro Gennari e minha amiga Vilma Gennari, pelo carinho, acolhimento e momentos de alegria. Minha nova família paulista!

As minhas grandes professoras, amigas e incentivadoras de graduação, Magnely Moura, Mirizana Alves e Vilena Figueiredo, divido esta vitória com vocês!

Aos amigos da dança, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos funcionários dos biotérios, pelo cuidado e manutenção dos animais.

Ao programa de pós graduação de Fisiopatologia Experimental, especialmente a Tânia pela disponibilidade com que sempre se prontificou a ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.

Charles Chaplin

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	Hipertensão Arterial Sistêmica: Conceito e Epidemiologia.....	2
1.2	Mecanismos Fisiopatológicos da Hipertensão Arterial.....	3
1.3	Variabilidade da Pressão Arterial e Lesão de órgão alvo.....	5
1.4	Adaptações periféricas na Hipertensão Arterial.....	7
1.5	Marcadores de Hipertrofia Cardíaca Patológica.....	8
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	Objetivo geral.....	12
3.2	Objetivos específicos.....	12
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1	Desenho Experimental.....	14
4.2	Exames e Procedimentos Cirúrgicos	15
4.3	Desnervação aórtica.....	16
4.4	Desnervação carotídea.....	16
4.5	Ligadura da artéria do corpo carotídeo.....	16
4.6	Desnervação Sinoaórtica.....	18
4.7	Avaliação Morfofuncional pelo Ecocardiograma.....	18
4.8	Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	20
4.8.1	Canulação.....	20
4.8.2	Gasometria do Sangue Arterial.....	21
4.8.3	Registro de pressão arterial.....	21
4.8.4	Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores.....	22
4.8.5	Avaliação da Sensibilidade dos quimiorreceptores.....	24
4.8.6	Modulação Autonômica Cardiovascular.....	24
4.8.7	Controle Autonômico da Frequência Cardíaca.....	25

4.8.8	Avaliação da Função Ventricular pela Cateterização do Ventrículo Esquerda.....	25
4.8.9	Avaliação do Fluxo Sangüíneo – Método das Microesferas Coloridas.....	26
4.9	Eutanásia.....	29
4.10	Avaliação Histológica.....	30
4.10.1	Hipertrofia ventricular esquerda.....	30
4.11	PCR Quantitativo em Tempo Real de Genes Relacionados com a Hipertrofia Cardíaca.....	31
4.11.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	31
4.11.2	Quantificação de RNAm por PCR quantitativo em tempo real.....	32
4.11.3	Genes relacionados com a hipertrofia cardíaca.....	32
4.12	Histoquímica para Miosina ATPase do Músculo Esquelético Sóleo.....	33
4.13	Análise estatística.....	34
5	RESULTADOS.....	35
	PROTOCOLO 1.....	37
5.1	Peso corporal.....	38
5.2	Avaliação ecocardiográfica.....	38
5.3	Gasometria do Sangue Arterial.....	40
5.4	Avaliações Hemodinâmicas Sistêmicas.....	41
5.5	Sensibilidade Barorreflexa.....	41
5.6	Sensibilidade Quimiorreflexa.....	42
5.7	Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial.....	44
5.8	Controle autonômico da frequência cardíaca.....	46
5.9	Avaliações invasivas da função ventricular esquerda.....	48
5.10	Aspectos Morfológicos e Histológicos.....	49
5.10.1	Avaliação de Hipertrofia Cardíaca	49
5.10.2	Diâmetro de cardiomiócitos.....	49
5.10.3	Quantificação de colágeno.....	50
5.10.4	Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real.....	51
5.10.5	Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização.....	52
5.11	Fluxo sanguíneo regional.....	55
5.12	Débito e índice cardíaco.....	55
5.13	Resistência vascular periférica total.....	56
	PROTOCOLO 1 - Sumário dos resultados.....	57

	PROTOCOLO 2.....	86
5.14	Peso corporal.....	87
5.15	Avaliação ecocardiográfica.....	88
5.16	Gasometria do sangue arterial.....	90
5.17	Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	91
5.18	Sensibilidade Barorreflexa.....	92
5.19	Sensibilidade Quimiorreflexa.....	93
5.20	Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial.....	95
5.21	Controle autonômico da frequência cardíaca.....	98
5.22	Avaliações invasivas da função ventricular esquerda.....	100
5.23	Aspectos morfológicos e histológicos.....	101
5.23.1	Avaliação de hipertrofia cardíaca.....	101
5.23.2	Diâmetro de cardiomiócitos.....	101
5.23.3	Quantificação de colágeno.....	102
5.23.4	Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real.....	103
5.23.5	Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização.....	104
5.24	Fluxo sanguíneo regional.....	107
5.25	Débito e índice cardíaco.....	107
5.26	Resistência vascular periférica total.....	108
	PROTOCOLO 2 - Sumário dos resultados.....	110
	PROTOCOLO 3.....	86
5.27	Peso corporal.....	87
5.28	Avaliação ecocardiográfica.....	88
5.29	Gasometria do sangue arterial.....	90
5.30	Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	91
5.31	Sensibilidade Barorreflexa.....	92
5.32	Sensibilidade Quimiorreflexa.....	93
5.33	Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial.....	95
5.34	Controle autonômico da frequência cardíaca.....	98
5.35	Avaliações invasivas da função ventricular esquerda.....	100
5.36	Aspectos morfológicos e histológicos.....	101
5.36.1	Avaliação de hipertrofia cardíaca.....	101
5.36.2	Diâmetro de cardiomiócitos.....	101

5.36.3	Quantificação de colágeno.....	102
5.36.4	Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real.....	103
5.36.5	Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização.....	104
5.37	Fluxo sanguíneo regional.....	107
5.38	Débito e índice cardíaco.....	107
5.39	Resistência vascular periférica total.....	108
	PROTOCOLO 3 - Sumário dos resultados.....	110
6	DISCUSSÃO.....	113
6.1	Adaptações sistêmicas na hipertensão arterial.....	115
6.2	Influência relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores nas adaptações morfofuncionais cardíacas e periféricas na hipertensão arterial.....	120
7	CONCLUSÃO.....	128
8	REFERÊNCIAS.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF: Alta Frequência

ANF: *Atrial Natriuretic Factor* (Fator Natriurético Atrial)

ANOVA: Análise de Variância

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

BF: Baixa Frequência

CTR: controle

DA: Desnervação Aórtica

DC: Desnervação Carotídea

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Desvio Padrão

DSA: Desnervação Sinoaórtica

EA: Efeito da atropina

EP: Efeito do Propranolol

EPM: Erro Padrão da Média

ERP: Espessura Relativa da Parede

FC: Frequência Cardíaca

FEj: Fração de Ejeção

FE: Fração de encurtamento

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

GMP: Guanosina Monofosfato

HA: Hipertensão Arterial

HC: Hipertrofia cardíaca

HE: Hematoxilina-Eosina

HF: *High Frequency* (alta frequência)

HVE: Hipertrofia do ventrículo esquerdo

IBR: Índice de Bradicardia Reflexa

IDM: Índice de Desempenho Miocárdico

IP: Intervalo de Pulso

ITR: índice de Taquicardia Reflexa

LA: Ligadura da Artéria do Corpúsculo Carotídeo

LF: *Low Frequency* (baixa frequência)

ME: Músculo Esquelético

MBF: Muito Baixa Frequência

Modo M: Modo Monodimensional

MPI: Índice de Performance Miocárdica

MVE: Massa Ventricular Esquerda

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

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: Ácido Ribonucleico Mensageiro

PPDIA: Parede Posterior do Ventrículo na Diástole

SHR: *Spontaneous/y Hypertensive Rats* (Ratos Espontaneamente Hipertensos)

SHRDA:Ratos Espontaneamente Hipertensos com Desnervação aórtica

SHRDC:Ratos Espontaneamente Hipertensoscom Desnervação Carotídea

SHRLA:Ratos Espontaneamente Hipertensoscom Ligadura da Artéria que Irriga o

Corpúsculo Carotídeo

SHRDSA:Ratos Espontaneamente Hipertensos com Desnervação Sinoaórtica

SVDIA: Espessura Diastólica Do Septo Interventricular

VARIP: Variância do Intervalo de Pulso

VPAS: Variância da Pressão Arterial Sistólica

VEDIA: cavidade do ventrículo esquerdo (VE) ao final da diástole (VEDIA)

TRIV: Tempo de Relaxamento Isovolumétrico

VE: Ventrículo Esquerdo

VEDIA: Ventrículo Esquerdo na Diástole

VEC: Velocidade de Encurtamento Circunferencial

VESIS: Ventrículo Esquerdo na Sístole

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VARIP: Variabilidade do Intervalo de Pulso

VPA: Variabilidade da Pressão Arterial

β -MHC:*Beta-myosin heavy chain*(Beta Miosina De Cadeia Pesada)

α -MHC:*Alpha-myosin heavy chain* (Alfa Miosina De Cadeia Pesada)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Desenho Experimental.....	15
Figura 2-	Inervação do corpo carotídeo e dos barorreceptores carotídeos da bifurcação da carótida. (Desenho S. Lacchini).....	17
Figura 3-	Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).....	22
Figura 4-	Classificação dos diferentes subtipos de fibras musculares na escala de coloração atribuída para cada tipo de fibra no pH 10.3. Na cor branca as fibras do tipo I, pretas tipo IIA e na escala de cinza claro e escuro as fibras do tipo IIB e intermediária respectivamente.....	34
Figura 5-	Respostas de bradicardia e taquicardia reflexas às variações de PA dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	42
Figura 6-	Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN nas doses de 20,40 e 80 $\mu\text{g/kg}$ (i.v). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	43
Figura 7-	Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) no grupo normotenso (CTR) e no grupo espontaneamente hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student $\$ p \leq 0,05$ versus CTR.....	45
Figura 8-	Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) no grupo normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student $p \leq 0,05$ $\$ p \leq 0,05$ versus CTR.....	45
Figura 9-	Índice alfa nos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($p \leq 0,05$).....	46
Figura 10-	. Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	47
Figura 11-	Pressão diastólica final (PDF) dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student. ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	48
Figura 12-	Diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos normotenso (CTR) e	

	hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	50
Figura 13	Percentual de colágeno expresso no VE nos grupos normotenso (CTR) e hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	50
Figura 14-	Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo dos animais normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	52
Figura 15-	Razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais controles (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	53
Figura 16-	Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo diafragma de animais normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	54
Figura 17-	Resistência vascular periférica total (RVPT) nos grupos de normotensos (CTR) e hipertensos (SHR). Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student ($\$ p \leq 0,05$ versus CTR).....	56
Figura 18-	Respostas de bradicardia e taquicardia reflexas às variações de PA dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).....	66
Figura 19-	Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN ($\mu\text{g/Kg}$, i.v) grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; † $p \leq 0,05$ versus SHRDA).....	68
Figura 20-	Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação	

	carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $p \leq 0,05$ versus SHR; † $p \leq 0,05$ versus SHRDA; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).....	70
Figura 21-	Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $p \leq 0,05$ versus SHR; † $p \leq 0,05$ versus SHRDA).....	71
Figura 22-	Índice alfa nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One waypost hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).....	72
Figura 23-	Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $p \leq 0,05$ versus SHR; † $p \leq 0,05$ versus SHRDA).....	73
Figura 24-	Pressão diastólica final (PDF) dos grupos hipertensos (SHR) e hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One waypost hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).....	74
Figura 25-	Diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos hipertensos (SHR), hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc bonferroni)..	76
Figura 26-	Percentual de colágeno expresso no VE dos grupos hipertensos (SHR), hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc Bonferroni).	77
Figura 27-	Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo de animais espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA) hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e	

	hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; † $p \leq 0,05$ versus SHRDA).....	79
Figura 28-	Razão capilar/fibra no músculo sóleo de animais espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA) hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).....	80
Figura 29-	Resistência vascular periférica (RVP) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc bonferroni).....	82
Figura 30-	Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas às variações de PA dos grupos controle (SHR), SHR com desnervação aórtica (SHRDA), SHR com desnervação carotídea (SHRDC), SHR com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e SHR com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).....	92
Figura 31-	Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN ($\mu\text{g/Kg}$, i.v) nos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).....	94
Figura 32-	Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaortica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR; + $P \leq 0,05$ versus SHRDC; # $P \leq 0,05$ versus SHRLA).....	96
Figura 33-	Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica	

	(SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).....	97
Figura 34-	Índice alfa nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaortica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).....	98
Figura 35-	Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).....	99
Figura 36-	Pressão diastólica final (PDF) nos grupos hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).....	100
Figura 37-	Diâmetro dos cardiomiócitos (mm) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).....	102
Figura 38-	Percentual de colágeno expresso no VE nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).....	103
Figura 39-	Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo nos grupos hipertenso (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).....	105
Figura 40-	Razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais espontaneamente	

	hipertenso (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One waypost hoc Bonferroni ($*p \leq 0,05$ versus SHR).....	106
Figura 41-	Resistência vascular periférica total (RVPT) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($*p \leq 0,05$ versus SHR).....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Peso corporal dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final).....	38
Tabela 2-	Variáveis ecocardiográficas de morfometria e função cardíaca dos grupos normotensos (CTR) e hipertenso (SHR).....	39
Tabela 3-	Gasometria arterial dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR)..	40
Tabela 4-	Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR).....	41
Tabela 5-	Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR).....	44
Tabela 6-	Peso do coração e dos ventrículos corrigidos pela tibia dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR).....	49
Tabela 7-	Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos normotenso (CTR) e hipertensos (SHR).....	51
Tabela 8-	Fluxo sanguíneo regional dos grupos normotenso (CTR) e nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR).....	55
Tabela 9-	Débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos de normotensos (CTR) e hipertensos (SHR).....	56
Tabela 10	Sumário dos resultados do Protocolo 1. Significado dos símbolos: (●) valores semelhantes vs. CTR; (+) valores superiores vs. CTR; (-) valores inferiores vs. CTR.....	57
Tabela 11	Peso corporal dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final).....	61
Tabela 12	Variáveis ecocardiográficas de morfometria e função cardíaca dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	63
Tabela 13	Gasometria arterial dos grupos hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	64
Tabela 14	Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA).....	65
Tabela 15	Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	69

Tabela 16	Peso dos corações e ventrículos corrigidos pela tibia dos diferentes grupos experimentais.....	75
Tabela 17	Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	78
Tabela 18	Fluxo sanguíneo regional dos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	81
Tabela 19	Débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	81
Tabela 20	Sumário dos resultados do protocolo 2. Significado dos símbolos: valores semelhantes vs. SHR; (+) valores superiores vs. SHR; (-) valores inferiores vs. SHR.....	83
Tabela 21	Peso corporal dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final)..	87
Tabela 22	Variáveis ecocardiográficas de morfometria cardíaca dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação aórtica (SHRDSA).....	89
Tabela 23	Gasometria arterial dos grupos hipertensos com as diferentes desnervações: grupos controle (SHR), desnervação aórtica (SHRDA), desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	90
Tabela 24	Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos ratos espontaneamente hipertensos dos grupos controle (SHR), desnervação aórtica (SHRDA), desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	91
Tabela 25	Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	95
Tabela 26	Peso dos corações e ventrículos corrigidos pela tibia dos diferentes grupos experimentais submetidos a diferentes desnervações.....	101
Tabela 27	Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea	104

	(SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	
Tabela 28	Fluxo sanguíneo regional no grupo hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	107
Tabela 29	Débito cardíaco e do índice cardíaco no grupo hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).....	108
Tabela 30	Sumário dos resultados do protocolo 3. Significado dos símbolos: (●) valores semelhantes vs. SHR; (+) valores superiores vs. SHR (-) valores inferiores vs. SHR.....	110

RESUMO

Souza PRM. *Influência da desnervação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores nas variáveis hemodinâmicas e morfofuncionais dos tecidos cardíaco e músculo-esquelético em ratos espontaneamente hipertensos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial na qual há a interação de vários mecanismos, e está relacionada com alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo. Alterações funcionais dos mecanismos regulatórios da pressão arterial (PA) a curto prazo, como os barorreceptores e os quimiorreceptores, vem sendo bastante exploradas com o objetivo de entender os possíveis mecanismos que podem estar relacionadas à gênese da HA. Diante disso, utilizamos o modelo experimental de desnervação sinoaórtica (DSA) e desnervação seletiva desses aferentes (aórtica DA) e/ou carotídea (DC) e a ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (LA) para avaliarmos a importância relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores no controle neurogênico da circulação mediando respostas cardíacas e músculo-esqueléticas na HA. Para tanto, utilizamos ratos Wistar (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos às diferentes desnervações (SHRDSA/ SHRDA / SHRDC), bem como, a ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA). Os animais foram acompanhados durante 10 semanas após as desnervações seletivas, e em seguida foram realizadas as avaliações ecocardiográficas, gasometria arterial, hemodinâmicas, autonômicas e de fluxo sanguíneo regional. Posteriormente, os animais foram eutanasiados para a coleta dos tecidos para as avaliações gênicas e histológicas. **Resultados:** Os animais SHR apresentaram disfunções hemodinâmicas, autonômicas e gasométricas (alcalose respiratória) quando comparado ao grupo CTR, assim como nas análises de hipertrofia, fluxo e histologia do músculo esquelético, como transição no fenótipo para um perfil mais glicolítico no sóleo e aumento da área de secção transversa das fibras do tipo I e redução das fibras do tipo IIB no músculo diafragma. Nos grupos experimentais hipertensos, os animais com prejuízo do quimiorreflexo (SHRDC, SHRLA e SHRDSA), apresentaram valores maiores de pCO_2 em relação ao grupo SHR e SHRDA. Todos os grupos com as diferentes desnervações apresentaram alterações autonômicas, de fluxo sanguíneo e de capilarização. Entretanto, nossos maiores achados foram em relação ao grupo SHRDA, que apresentou valores significativamente maiores que o grupo SHR nos parâmetros PAS (212 ± 2 vs 200 ± 3), PAD (156 ± 4 vs 144 ± 3) PAM

(185 ± 9 vs 172 ± 3) e FC (377 ± 4 vs 350 ± 7). Além disso, apresentou aumento da variabilidade da PA (VPAS), bem como o simpático periférico (BFPAS), contrariamente ao observado nos grupos SHRDC e SHRLA em relação ao grupo SHR. No controle autonômico da FC, o grupo SHRDA apresentou menor efeito parassimpático e maior efeito simpático em relação ao grupo SHR. Já os grupos SHRDC e SHRLA apresentaram um menor efeito parassimpático, sem alterações no efeito simpático, embora a resistência vascular periférica estivesse aumentada no grupo SHRLA. As adaptações morfofuncionais cardíacas (ecocardiografia e marcadores de hipertrofia cardíaca) foram mais evidentes no grupo que apresentava disfunção total de ambos receptores (SHRDSA). **Conclusão:** A ausência do controle reflexo exercido predominantemente pelos barorreceptores arteriais demonstrou uma maior influência do componente aórtico do que o carotídeo sobre a PA. Em adição, a função sistólica parece maior nos grupos SHRDA e SHRDSA, sugerindo que a desnervação aórtica esteja associada com ativação simpática. Não se observou alteração cardíaca na desnervação carotídea. Em relação ao músculo esquelético, todas as desnervações mostraram aumento de capilarização, enquanto somente o grupo SHRDSA mostrou redução de fibras intermediárias. O aumento de capilarização pode estar associado com a liberação do simpático periférico nas desnervações que incluem a retirada dos barorreceptores aórticos, levando ao aumento de VPA e à ausência dos quimiorreceptores nos grupos com desaferentação dos receptores carotídeos.

Descritores: Hipertensão/fisiopatologia; Barorreflexo; Células quimiorreceptoras/fisiologia; Denervação autônoma/métodos; Sistema nervoso autônomo; Ratos Wistar; Ratos endogâmicos SHR; Hipertrofia ventricular esquerda/patologia; Músculo esquelético; Pressão sanguínea/fisiologia

ABSTRACT

Souza PR. *Influence of selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors in hemodynamic variables and tissue morphofunctional cardiac and musculoskeletal in spontaneously hypertensive rats* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Arterial hypertension (AH) is a multifactorial disease on which there is the interaction of several mechanisms, therefore is related to functional and / or structural changes of the target organ. Functional changes of the regulatory mechanisms of blood pressure (BP) in the short term, as pressoreceptor and chemoreceptors, has been extensively explored in order to understand the possible mechanisms that may be related to the genesis of hypertension. Thus, we used the experimental model of sinoaortic denervation (DSA) and selective denervation of those afferent aortic (DA) and / or carotid (DC) and the ligation of the carotid body artery (LA) to evaluate the relative importance of baroreceptors and chemoreceptors on control of neurogenic circulation mediating cardiac and musculoskeletal responses in HA. Thereby, we used Wistar rats (CTR) and spontaneously hypertensive rats (SHR) subjected to different denervation (SHRDSA / SHRDA / SHRDC) and the ligation of the carotid body artery (SHRLA). The animals were followed for 10 weeks after the selective denervation it was performed echocardiographic evaluations, blood gas, hemodynamic, autonomic and regional blood flow. Subsequently, the animals were euthanized for tissue collection for genetic and histological evaluations. **Results:** SHR animals showed hemodynamic, autonomic dysfunction and gas exchange (respiratory alkalosis) compared to CTR group as well as the analysis of hypertrophy, flow and histology of skeletal muscle, such as the transition to a more glycolytic phenotype profile in soleus and increased cross-sectional area of type I fibers and reduction of type IIB fibers in the diaphragm. In hypertensive experimental groups, animals with prejudice chemoreflex (SHRDC, SHRLA and SHRDSA), showed higher $p\text{CO}_2$ compared to SHR and SHRDA group. All groups with different denervation showed autonomic changes in blood flow and capillarization. However, our major findings were compared to SHRDA group, which was significantly higher than the SHR in SBP (212 ± 2 vs 200 ± 3), DBP (156 ± 4 vs 144 ± 3), MAP (185 ± 9 vs 172 ± 3) and HR (377 ± 4 vs 350 ± 7) parameters.

Furthermore, we showed an increase in BP variability (BPV) and in the peripheral sympathetic (BFPAS), otherwise showed in the groups SHRDC and SHRLA compared to SHR. Autonomic control of HR, the SHRDA group showed lower sympathetic and higher parasympathetic effect in relation to SHR. Already SHRDC and SHRLA groups had a lower parasympathetic effect without changes in sympathetic, although peripheral vascular resistance was increased in SHRLA group. The cardiac morphofunctional adaptations (echocardiography and cardiac hypertrophy markers) were more evident in the group that had total dysfunction of both receptors (SHRDSA).

Conclusion: The absence of reflex control exerted by arterial baroreceptors predominantly showed a greater influence of the aortic component of the carotid on BP. In addition, systolic function appears higher in groups SHRDA and SHRDSA, suggesting that aortic denervation is associated with sympathetic activation. No cardiac abnormality was observed in the carotid denervation. Regarding skeletal muscle, all denervations showed an increased of capillarization, while only SHRDSA group showed reduction of intermediate fibers. Increased capillarization may be associated with the release of the peripheral sympathetic denervation, including removal of the aortic baroreceptors, leading to increased VPA and the absence of chemoreceptors in groups with deafferentation of the carotid receptors.

Descriptors: Hypertension/physiopathology; Baroreflex; Chemoreceptor cells; Autonomic denervation/methods; Autonomic nervous system; Rats, Wistar; Rats, inbred SHR; Hypertrophy, left ventricular/pathology; Muscle, skeletal; Blood pressure/physiology

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica: Conceito e epidemiologia

A Hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica, conceituada como uma condição clínica multifatorial, silenciosa e caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) associada frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais ([VI Brazilian Guidelines on Hypertension], 2010)

Em relação aos custos e a sua epidemiologia no Brasil, a HA representa um importante problema de saúde pública por apresentar uma forte relação com a morbimortalidade, o que gera gastos com custos médicos e socioeconômicos. Estima-se que mais de 30% da população adulta brasileira esteja hipertensa, e esse percentual aumenta para 63% quando direcionada para a faixa etária igual ou maior que 65 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Apesar das evidências epidemiológicas, e considerando que a HA é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de importantes manifestações clínicas cardiovasculares, é indiscutível a importância dos fatores relacionados à compreensão da sua fisiopatologia, tanto para o seu melhor controle como para a redução dos seus agravos (NOBRE; RIBEIRO; MION, 2010; NOGUEIRA et al., 2010).

1.2 Mecanismos Fisiopatológicos da Hipertensão Arterial

A HA por ser um problema de saúde pública altamente prevalente em todo mundo, tem sido um dos principais objetos de estudos experimentais e clínicos nas últimas décadas. Isso porque envolve uma complexidade de adaptações nos sistemas de regulação central como também adaptações morfofuncionais cardíacas, renais e arteriais que interagem e desempenham um papel fundamental nessa desordem. Além destes, os mecanismos subjacentes que também influenciam nos aumentos sustentados da pressão arterial, apesar de serem bastante investigados, ainda não são totalmente bem compreendidos (ZOCCAL; MACHADO, 2011).

Um acúmulo de evidências mostra que a redução da atividade nervosa simpática diminui a PA em pacientes hipertensos, sugerindo que hiperatividade simpática é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento e manutenção da HA (ESLER, 2010; MALPAS, 2010). Além disso, dados experimentais indicam que a atividade aumentada do sistema nervoso simpático é fundamental para a progressão dos elevados níveis de PA em modelos de roedores de hipertensão (MALPAS, 2010). No entanto, apesar das evidências sobre a hiperatividade simpática, outros fatores também têm sido considerados possíveis moduladores para o desenvolvimento da HA, o que torna difícil estabelecer quais apresentam papel predominante no desencadeamento e manutenção dos elevados níveis pressóricos (IRIGOYEN et al., 1991)

Independente dos fatores etiológicos, os mecanismos regulatórios da PA a curto prazo constituem um sistema tônico e potente para manutenção da pressão arterial dentro de faixas relativamente estreitas de variação (FERNANDES, T. L. et al., 2010; MICHELINI, 2001). Esse controle é exercido através de receptores especializados como os barorreceptores arteriais que são mecanorreceptores sensíveis às deformações

da parede vascular. Além desses, os quimiorreceptores, sensíveis às alterações da pressão parcial de oxigênio, dióxido de carbono e concentração de íons de hidrogênio no sangue, e os receptores cardiopulmonares que regulam a volemia são também sensores importantes na homeostase cardiovascular. Esses receptores, em conjunto funcionam através de arcos reflexos conduzindo constantemente informações dos níveis pressóricos, pH e volemia para os ajustes compensatórios dos eferentes autonômicos cardiovasculares simpático e parassimpático (FRANCHINI; KRIEGER, 1992; IRIGOYEN et al., 1991).

Assim como na HA, várias doenças cardiovasculares acompanham-se de maior ou menor grau de deficiência dos mecanismos regulatórios da PA a curto prazo. Na HA, os barorreceptores sofrem deslocamento da sua faixa de funcionamento para um novo nível de PA acompanhado também pela redução da sua sensibilidade (KRIEGER; SALGADO; MICHELINI, 1982). Por outro lado, a atividade dos quimiorreceptores encontra-se aumentada, apresentando alterações morfofuncionais e bioquímicas, as quais podem estar relacionadas com seu papel fisiopatogênico na elevação crônica da PA (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

Mancia et al. (1983) e Irigoyen e Krieger (1998) entre outros, observaram que a redução da sensibilidade do barorreflexo ocasiona aumento da variabilidade da PA (VPA) e também redução da variabilidade do IP (VIP), que em conjunto, podem ocasionar danos em órgãos-alvo por aumentar a tensão da parede vascular e/ou cardíaca a cada pico de elevação da PA (FARAH VDE et al., 2007; FLORAS et al., 1988). Adicionalmente, estudos demonstraram que a VPA em pacientes hipertensos está significativamente associada a complicações cardiovasculares como isquemia coronariana e acidente vascular cerebral (PARATI; VALENTINI, 2006; SANDERS, 2000). A alteração desses parâmetros, ou seja, redução da sensibilidade do barorreflexo

e da VIP, já foi descrita na literatura como um importante preditor de mortalidade cardíaca após evento isquêmico do miocárdio (KLEIGER et al., 1987; LA ROVERE et al., 1998; PARATI; STAESSEN, 2007)

Com esses achados, vários grupos de pesquisas tem se dedicado a investigar a influência direta da VPA em modelos experimentais tentando responder se a mesma seria um fator independente de lesão de órgão-alvo ou até mesmo preditor de mortalidade (CERONI et al., 2009; FLUES et al., 2012; IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; KRIEGER, 1964; MIAO et al., 2006).

1.3 Variabilidade da Pressão Arterial e Lesão de Órgão

Como citado anteriormente, os barorreceptores são fundamentais para a manutenção da homeostase da circulação, evitando para que a mesma não sofra grandes flutuações (FERNANDES; HASHIMOTO; OLIVEIRA, 2010).

Um modelo experimental de ausência completa da função dos barorreceptores vem sendo intensamente utilizado para o estudo da VPA e sua relação com lesão de órgãos-alvo (FLUES et al., 2012; MIAO et al., 2006; MORAES-SILVA et al., 2010; MOSTARDA et al., 2011; NORMAN; COLEMAN; DENT, 1981; PIRATELLO et al., 2010). Esse modelo foi descrito em ratos por Krieger (1964) sendo denominado desnervação sinoaórtica (DSA), que consiste em uma secção cirúrgica das fibras aferentes dos barorreceptores. Embora tenha sido descrito como um modelo de hipertensão neurogênica, sabe-se atualmente que a hipertensão restringe-se à fase aguda (FRANCHINI; KRIEGER, 1992) permanecendo um aumento acentuado da VPA que se mantém mesmo após a normalização dos níveis pressóricos (BARRES et al., 1992; IRIGOYEN et al., 1995).

Estudos utilizando esse modelo em ratos normotensos verificaram que a VPA é um fator de risco independente de lesão de órgão-alvo, podendo contribuir adicionalmente com alterações relacionadas ao desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares, como: hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE), lesão glomerular e hipertrofia aórtica (MIAO et al., 2006).

Tentando entender se a HVE estaria associada com a hipertensão e VPA, dados recentes do nosso grupo utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos à DSA, mostraram que esses animais apresentaram elevados níveis de angiotensina II e uma concentração reduzida de angiotensina 1-7 no VE (PIRATELLO et al., 2010). Além desses resultados, nosso grupo também demonstrou que a disfunção dos barorreceptores em ratos SHRs atenuou as diversas adaptações hemodinâmicas e morfofuncionais induzidas pelo treinamento físico aeróbio (MORAES-SILVA et al., 2010).

Além da DSA, a contribuição relativa dos barorreceptores aórticos e baro e quimiorreceptores carotídeos na regulação da PA também tem sido avaliada através da desnervação seletiva desses receptores. Bunag e Butterfield (1982) e Fink (1981) demonstraram que a desnervação seletiva dos barorreceptores aórticos promove um grande aumento da VPA, enquanto a desnervação seletiva dos barorreceptores carotídeos praticamente não altera essa variabilidade (ITO; SCHER, 1978). Já na desnervação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos em ratos normotensos, observou-se agudamente uma resposta hipotensora após a desaferentação quimiorreflexa (FRANCHINI; KRIEGER, 1992). Esses estudos em conjunto demonstram a importância da integridade desses mecanismos no controle da PA, uma vez que os barorreceptores exercem um controle tônico inibitório e os quimiorreceptores um

controle excitatório da atividade nervosa simpática, participando ambos no controle da homeostase cardiocirculatória.

Estudos envolvendo desnervação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores em animais espontaneamente hipertensos (SHR) ainda são escassos. O uso da técnica de desnervação seletiva em animais SHR parece ser um modelo ideal para responder questões sobre a modulação dos componentes aferentes sobre as respostas adaptativas crônicas cardiocirculatórias na hipertensão. De fato, vários trabalhos recentes da literatura sobre o papel do barorreflexo em diferentes condições fisiopatológicas, tem apresentado a mesma limitação: não conseguiram separar os efeitos da retirada dos barorreceptores dos efeitos da retirada dos quimiorreceptores nesse modelo.

A proposta deste trabalho é justamente buscar alternativas de entendimento de cada grupo desses receptores. A abordagem da desnervação seletiva dos quimio e barorreceptores, bem como a utilização de modelos de normo e hipertensão poderão certamente contribuir para o preenchimento dessas lacunas no conhecimento do controle neurogênico do sistema cardiocirculatório e suas repercussões não só sobre o coração, que são as mais evidentes, mas também nas adaptações periféricas como na musculatura esquelética.

1.4 Marcadores de Hipertrofia Cardíaca Patológica

A hipertrofia cardíaca (HC) é uma resposta compensatória adaptativa à sobrecarga de trabalho, podendo ser fisiológica ou patológica, desencadeada por diversos fatores, como: fatores mecânicos, neurais e hormonais (FRANCHINI, 2001; BING et al., 2002). Em situações patológicas, como na HA, a sobrecarga hemodinâmica

imposta cronicamente às câmaras cardíacas é acompanhada de alterações na expressão de genes cardíacos e/ou na reexpressão de genes de reprogramação fetal, apontados como marcadores de HC patológica (DONALDSON et al., 2012).

Em animais experimentais com HC, há um aumento na expressão de genes como fator natriurético atrial (ANF), α -actina esquelética e da β -cadeia pesada da miosina (β -MHC), normalmente expressos durante o desenvolvimento embrionário (CHIEN, 1993; SCHWARTZ et al., 1992).

Além dos achados de Miao & Cols, (2006) sobre a VPA como fator independente de lesão de órgãos-alvo, nosso grupo também demonstrou em ratos normotensos submetidos à DSA um aumento acentuado de marcadores de HC, como ANF e α -actina esquelética nos ventrículos direito e esquerdo, além do aumento de fibrose, avaliados através da expressão gênica de colágenos do tipo I e III (FLUES et al., 2012; MORAES-SILVA et al., 2010)

Dessa forma, utilizando o modelo de hipertensão espontânea, avaliaremos a importância relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores sobre a expressão gênica de marcadores de HC, como ANF, α -actina esquelética, β e α -cadeia pesada da miosina (β -MHC, α -MHC) uma vez que não existem dados na literatura nesse sentido.

1.5 Adaptações Periféricas na Hipertensão Arterial

Na HA, independente dos fatores etiológicos, o maior determinante para os elevados níveis pressóricos arteriais é o aumento da resistência vascular periférica, que pode ser atribuído às alterações frequentemente observadas no leito vascular, como: aumento do tônus das arteríolas, hipertrofia do músculo liso vascular e rarefação capilar (SILVESTRE; LEVY, 2000). Essas alterações no leito vascular estão associadas à

hiperatividade simpática que é observada em indivíduos hipertensos (ESLER, 2000). Não obstante, essa disfunção autonômica presente não só na hipertensão, mas em outras doenças cardiovasculares, também está associada com outras alterações periféricas, como alterações no fenótipo das fibras musculares esqueléticas (BACURAU et al., 2009; SILVESTRE; LEVY, 2000).

As fibras musculares esqueléticas possuem particularidades que permitem sua classificação em tipos distintos seguindo critérios associados à expressão da cadeia pesada de miosina, à velocidade de contração e certas propriedades bioquímicas. De maneira geral, pode-se classificar as fibras musculares em fibras do tipo I, oxidativas e de contração lenta, e fibras do tipo II com seus diferentes subtipos (IIA, IIB e IIX) com características glicolíticas e de contração rápida (HERNELAHTI et al., 2005).

Em situações patológicas como na insuficiência cardíaca, a maior presença relativa de fibras glicolíticas (tipo II) pode contribuir para a incapacidade de sustentar um metabolismo oxidativo por períodos maiores. Como consequência, há uma antecipação do metabolismo anaeróbio sobre o oxidativo, o que tem sido relacionado com frequência, a uma intolerância aos esforços (ADAMS; DORING; SCHULER, 2008). Na HA, embora não seja consenso, alguns estudos têm associado às modificações estruturais na musculatura esquelética (ME) à rarefação vascular, mostrando tanto em humanos quanto em animais, alterações fenotípicas das fibras musculares de um perfil oxidativo para um perfil mais glicolítico (BORTOLOTTI; STEPHENSON; STEPHENSON, 1999; FRISK-HOLMBERG et al., 1983; HERNANDEZ et al., 1999; JUHLIN-DANNFELT et al., 1979; QUADRILATERO; RUSH, 2006).

Vale ressaltar que ainda não se sabe qual o fator determinante dessas alterações periféricas, como citado anteriormente. Acredita-se que essas adaptações sejam

decorrentes de diferentes mecanismos, entre eles a disfunção autonômica, mais precisamente a hiperatividade simpática (BACURAU et al., 2009; SILVESTRE; LEVY, 2000), que por sua vez é modulada pelas aferências de diferentes reflexos, além de substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes, sendo importante não só na gênese, mas na manutenção da HA (DEQUATTRO; FENG, 2002; KRIEGER; BRUM; NEGRAO, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

É sabido que o prejuízo da atividade reflexa dos mecanismos regulatórios da PA tem sido demonstrado não somente na HA, mas em outras patologias como *Diabete melito* e insuficiência cardíaca (FARAH VDE et al., 2007; GRASSI et al., 2009; LA ROVERE et al., 2009). E embora as alterações no tecido cardíaco sejam mais estudadas, evidências sugerem que a progressão da disfunção autonômica presente nas doenças cardiovasculares pode causar alterações periféricas em vasos e no músculo esquelético (ME) (ADAMS et al., 2008; HERNANDEZ et al., 1999)

De fato, em algumas doenças cardiovasculares incluindo a HA e a insuficiência cardíaca, foram observados prejuízos no ME, como por exemplo, aumento da presença de fibras glicolíticas, diminuição de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo e atrofia (BACURAU et al., 2009; HERNANDEZ et al., 1999; HERNELAHTI et al., 2005). Essas alterações estão bem documentadas na insuficiência cardíaca, condição na qual existe um grande prejuízo do barorreflexo, bem como alterações da perfusão periférica e central, associadas possivelmente à disfunção quimiorreflexa (PRABHAKAR; PENG, 2004). Na hipertensão essas modificações estruturais do ME

são menos conhecidas e não existem informações da importância relativa dos componentes aórtico e/ou carotídeo sobre as mesmas.

Diante do exposto, fica clara a importância de se investigar, na hipertensão, a influência da integridade dos mecanismos regulatórios da PA, comandados pelos pressoreceptores e quimiorreceptores não só no coração, mas também no músculo esquelético.

Dessa forma, a avaliação da importância relativa do barorreflexo e do quimiorreflexo, avaliados através da desnervação completa, carotídea ou aórtica isoladamente, bem como através da ligadura da artéria do corpo carotídeo (desnervação somente dos quimiorreceptores carotídeos) poderiam nos trazer novas informações sobre a modulação de um ou outro componente dos aferentes (carotídeos ou aórticos) sobre as respostas adaptativas crônicas cardíacas (coração) e periféricas (capilarização e músculo esquelético).

Diante do exposto, nossa hipótese é que a desnervação completa e/ou seletiva (aórtica ou carotídea) bem como a ligadura da artéria do corpo carotídeo (desnervação isolada do corpo carotídeo) tem efeitos diferentes e possivelmente antagônicos sobre o remodelamento cardíaco da hipertensão, além de influências adicionais sobre alterações fenotípicas da musculatura esquelética e sua vasculatura.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi verificar a importância do barorreflexo e quimiorreflexo através da deservação sinoaórtica e deservação seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores no controle neurogênico da circulação mediando respostas adaptativas cardíacas e músculo-esqueléticas na hipertensão arterial.

3.2. Objetivos específicos

Verificar nos diferentes grupos:

- Parâmetros Morfofuncionais pelo Ecocardiograma;
- Gasometria arteriais (pH, PaO₂, PaCO₂, HCO₃, Be);
- Parâmetros hemodinâmicos (PA, DC, FC e resistência vascular periférica;
- Parâmetros Autonômicos (sensibilidades barorreflexa e quimiorreflexa, efeito simpático e parassimpático);
- Modulação da variabilidade da frequência cardíaca e da PA no Domínio do tempo e da Frequência (Análise espectral FFT);
- Fluxo sanguíneo através do método das microesferas coloridas;
- Função, hipertrofia e expressão gênica no ventrículo esquerdo;
- Adaptações fenotípicas no músculo esquelético (Sóleo).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

A fase experimental foi iniciada quando os animais completaram 2 meses de idade (semana 1 do seguimento), na qual a hipertensão começa a se estabelecer no modelo SHR. A partir de então, os animais foram pesados e divididos em 5 grupos hipertensos e 1 normotenso. Cada grupo conteve 16 animais, onde oito foram utilizados somente para análises de fluxo sanguíneo e os outros oito para as demais análises. Os grupos foram divididos da seguinte forma: SHR (SHR), SHR com desnervação aórtica (SHRDA), SHR com desnervação carotídea (SHRDC) e SHR com ligadura da artéria do corpo carotídeo (SHRLA), SHR com desnervação sinoaórtica (SHRDSA) e grupo controle normotenso constituído de ratos Wistar (CTR). Após 10 semanas das desnervações foi realizada a seqüência experimental ilustrada abaixo (Figura 1).

Figura1. Desenho Experimental

4.2 Exames e Procedimentos Cirúrgicos

No exame de ecocardiografia, assim como em todos os procedimentos cirúrgicos, foi utilizado o anestésico Ketamina (50 mg/kg i.p.) e Xylazina (10mg/kg i.p.). Além disso, após o término das cirurgias os animais foram tratados com uma única injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil, Fontoura-Wyeth, 60.000 U).

4.3 Desnervação aórtica

O método de desnervação aórtica foi feito de acordo com o método tradicional de desnervação sinoaórtica descrito por (KRIEGER, 1964). O procedimento consiste de uma incisão mediana na região cervical anterior, separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vâsculo nervoso, constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático. As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado foram seccionadas, mantendo as fibras carotídeas e o corpúsculo carotídeo intactos. O outro contingente de fibras pressorreceptoras aórticas que podem situar-se junto ao laríngeo inferior foi interrompido quando seccionou-se o laríngeo superior (KRIEGER; MARSEILLAN, 1963).

4.4 Desnervação carotídea

O procedimento cirúrgico consistiu na localização da bifurcação da carótida que foi exposta e dissecada completamente nos dois lados, seccionando as fibras carotídeas e destruindo o corpúsculo carotídeo, mantendo as fibras pressorreceptoras aórticas intactas (KRIEGER; MARSEILLAN, 1963).

4.5 Ligadura da artéria do corpo carotídeo

Esta técnica consiste na ligadura bilateral da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (FRANCHINI; KRIEGER, 1992). Foi realizada através de uma incisão cervicallateral, posterior aos músculos esternocleidomastóideo. A bifurcação

carotídea foi exposta a uma visão lateral, a artéria do corpo carotídeo foi isolada pela retração suave das artérias carótideae occipitais externas, e posteriormente seccionadas, impedindo a irrigação sanguínea para o corpúsculo carotídeo. A eficácia da ligadura bilateral foi avaliada posteriormente através de injeções (i.v.) de cianeto de potássio (KCN).

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

4.6 Desnervação Sinoaórtica

O método de desnervação sinoaórtica foi feito de acordo com o descrito por (KRIEGER, 1964). O procedimento consiste de uma incisão mediana na região cervical anterior, separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vículo nervoso, constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático. As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado serão 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 será interrompido quando seccionar-se o laríngeo superior (KRIEGER; MARSEILLAN, 1963).

4.7 Avaliação Morfofuncional Cardíaca pelo Ecocardiograma

Ao final das 10 semanas de acompanhamento, os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica. As análises foram realizadas por um único observador e seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN et al., 1978). 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. 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, com as seguintes medidas: cavidade do ventrículo esquerdo (VE) ao final da diástole (VEDIA), 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). Também foram analisados o encurtamento relativo da parede posterior (ERP), função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FEj%), pelo método Simpson modificado e também pela velocidade de encurtamento circunferencial (VCFcirc/sec), 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: $FEj = (\text{volume diastólico final} - \text{volume sistólico final} / \text{volume diastólico final}) \times 100\%$. 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 (VMPicoE) – maior valor da velocidade de relaxamento rápido do ventrículo esquerdo (enchimento rápido do ventrículo), em milissegundos (ms) e VMPicoA a velocidade de relaxamento tardio do ventrículo esquerdo. Também foi avaliado o tempo de tempo de complacência ventricular (Desac. E m/s). 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. e velocidade de relaxamento tardio do ventrículo esquerdo (Relação E/A), enchimento isovolumétrico ventricular (TRIV ms) e o índice de performance miocárdica (MPI).

4.8 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

4.8.1 Canulação

Após as avaliações ecocardiográficas, os animais anestesiados foram submetidos a colocação de cateteres 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.

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. Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10 cm) durante a realização do experimento.

4.8.2 Gasometria do Sangue Arterial

Foram coletados da artéria femural dos animais acordados aproximadamente 0,4 ml de sangue com auxílio de uma seringa heparinizada (Heparin, heparina sódica 5000UI/ml, Cristália) e em seguida vedada com uma borracha para a não contaminação do sangue.

Para a análise do sangue foi utilizado o equipamento ABL 800 Flex (Radiometer Copenhagen), avaliando os seguintes parâmetros: potencial de hidrogênio iônico (pH), pressão parcial de oxigênio (PaO_2), pressão parcial de gás carbônico (PaCO_2), concentração de bicarbonato no plasma (HCO_3) e saturação de oxigênio (SatO_2).

4.8.3 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 PA 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 3). 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 3: Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).

4.8.4 Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores

Após o registro da PA, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

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

A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), 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 PA, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos barorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, foi usado para provocar queda da PA 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 foi dado um intervalo suficiente para que a PAM e FC retornassem aos valores próximos do basal. Para avaliação da sensibilidade dos barorreceptores, 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).

4.8.5 Avaliação da Sensibilidade dos Quimiorreceptores

A avaliação do quimiorreflexo foi realizada pela injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN, Merck) nas doses de 20, 40 e 80 $\mu\text{g/kg}$ (FRANCHINI; KRIEGER, 1992). O volume injetado foi de 0,10 a 0,15 ml. Simultaneamente, sinais de PA e FC foram registrados por um período de 15 segundos antes da injeção da droga e por um período de 15 segundos após a injeção da droga para posterior análise. Os valores de bradicardia obtidos pela comparação entre os valores basais e os valores após a injeção do KCN foram usados para quantificar as respostas bradicárdicas (RB-KCN) desencadeadas pela ativação dos quimiorreceptores.

4.8.6 Modulação Autonômica Cardiovascular

Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios do intervalo de pulso e PAS. A variabilidade desses parâmetros foi quantificada pela variância (IP e PAS).

Para a análise no domínio da frequência, a potência foi obtida usando o método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo de pulso e PA, 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).

4.8.7 Controle Autonômico da Frequência Cardíaca

Após a obtenção do registro para avaliação da sensibilidade dos barorreceptores, e com o retorno da frequência cardíaca e pressão arterial a valores próximos dos obtidos no registro basal, foi realizada a injeção de atropina (3 mg/kg) e após 5 minutos da injeção, a pressão arterial foi registrada por 5 minutos. Dessa forma, foi possível avaliar a participação simpática na modulação da frequência cardíaca. Ainda sob efeito da atropina, foi realizada a injeção de propranolol (4 mg/kg) e após 5 minutos da injeção, a frequência cardíaca foi registrada por 5 minutos. Com o duplo bloqueio farmacológico, atropina e propranolol, atinge-se a frequência cardíaca intrínseca. No dia seguinte, repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente invertendo-se a seqüência das injeções dos fármacos (bloqueio invertido).

Para avaliação do efeito simpático e parassimpático, a FC basal de cada rato foi considerada como sendo a média das frequências controle nos dois dias de experimento. Para o valor de FC atingido por cada droga foi considerada a resposta máxima de variação da FC após a administração de cada droga.

O efeito da atropina (EA) foi calculado pela subtração da FC atingida após a metilatropina menos a FC em repouso no estado basal. O efeito do propranolol (EP) representa a FC de repouso no estado basal menos a FC atingida após a administração do propranolol.

4.8.8 Avaliação da Função Ventricular pela Cateterização do Ventrículo Esquerdo

Para a avaliação da função ventricular, 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. 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 foram gravados durante um período de 5 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 da pressão diastólica final (PDF) do VE. A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição, detectando manualmente o ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do VE. Foram realizadas no mínimo 20 detecções por registro.

4.8.9 Avaliação do Fluxo Sanguíneo – Método das Microesferas Coloridas

Para determinação do fluxo sanguíneo foram utilizadas microesferas coloridas amarelas (Dye-Trak microespheres, Triton Technology). As microesferas são compostas de polystyrene (98%) e divinilbenzeno (2%) tendo diâmetro de $15,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e concentração comercial de 3000 esferas/ml.

Após o registro de PA foi injetada uma solução contendo 300.000 esferas/180 μl sonificadas durante 3 minutos imediatamente antes da infusão. Esta solução (180 μl) foi colocada em 75 cm de uma extensão de cateter P50 conectada a uma seringa de 1 ml

com salina pré-aquecida (40°C) contendo Tween 80 (0,01%). A cânula posicionada na aorta abdominal foi conectada a uma seringa de 1 ml, pré heparinizada, para retirada de sangue durante a infusão. Dez segundos, antes da injeção das esferas iniciou-se a retirada de sangue através de uma bomba de retirada a um fluxo de 0,5 ml/min que continuou por 75 segundos. Foram injetadas 300.000 esferas (amarelas) do VE a um fluxo de 0,36 ml/min durante 50 segundos. Desta forma, os 180 µl de solução contendo as microesferas foram injetadas nos primeiros 30 segundos.

O volume de sangue retirado foi repostado através do volume injetado durante a infusão das esferas e por um pequeno volume de salina (0,1-0,2 ml) injetado “*in bolus*” logo após o término do procedimento.

O animal foi sacrificado com uma *overdose* de pentobarbital sódico, injetado no peritônio e os tecidos foram retirados para análise (ventrículo esquerdo, ventrículo direito, rins direito e esquerdo, pulmões, gastrocnêmio e sóleo).

Digestão e processamento dos tecidos

As amostras de sangue foram pesadas e colocadas em tubos de polipropileno de 15 ml. Foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos. Adicionaram-se 4 ml de um reagente de hemólise ao pellet e centrifugou-se durante 30 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e colocou-se 2 ml de hidróxido de sódio (2N), e levado ao banho (90°C) e seguindo o mesmo procedimento dos demais tecidos.

Os tecidos foram processados segundo técnica adaptada de Hakkinen et al, 1995. Os tecidos foram pesados (0,4 – 1,2 g) e colocados em tubo de polipropileno de 15 ml, previamente identificado. Após a adição de 4 ml de hidróxido de sódio (2N) os tubos foram tampados e colocados em banho à 90°C por aproximadamente 2 horas. As amostras foram agitadas a cada 15 minutos até a dissolução dos tecidos. Os tubos foram removidos do banho e foi adicionado 8 ml de Reagente de Digestão. As amostras foram

misturadas por inversão (5x) e centrifugadas por 30 minutos à 2000g. Os sobrenadantes foram desprezados, adicionou-se 10 ml de Reagente de Contagem, e as amostras foram novamente colocadas no banho (90°C) por aproximadamente 3 horas. Os tubos foram agitados a cada 20 minutos até que não notasse debris. Após, retirada do banho, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2000g e o sobrenadante aspirado, permanecendo no tubo aproximadamente 100-200µl. Adicionou-se etanol absoluto (4°C), agitou-se os tubos para lavagem das amostras e centrifugou-se por 15 minutos a 2000g (4°C). O etanol foi aspirado, permanecendo 100-200µl no fundo dos tubos. As amostras foram colocadas em estufa (56°C) overnight para evaporação.

Extração do corante e medidas de absorbância

Para extração do corante, 250 µl de dimetilformamida foi colocada em cada tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas por 10 minutos à 2000g.

Colocou-se 200 µl do sobrenadante em uma cubeta de quartzo de 180 µl (Sigma) e realizou-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro. Os picos dos espectros de absorbância das microesferas amarelas foram usados a uma largura de banda de luz <1,8 nm. A absorbância mínima aceitável foi de 0,02 AU. Absorbâncias menores que estas foram excluídas da análise.

Determinação do fluxo sanguíneo

O volume de sangue coletado foi calculado dividindo o peso da amostra de sangue por 1,05 g/ml, a constante gravitacional específica do sangue. A constante de retirada do sangue (ml/min) foi determinada pela divisão do volume de sangue (ml) coletado pelo tempo (em minutos) de retirada da amostra. Para cada infusão, o cociente

da divisão da constante retirada do sangue pela AU da amostra de sangue foi utilizado como base para calcular o fluxo para os tecidos:

$$Q_t = A_t (Q_s/A_s)$$

Onde, Q_t e Q_s são o fluxo para o tecido ou sangue, e A_t e A_s são as absorbâncias do tecido ou do sangue, respectivamente.

Os fluxos sanguíneos foram divididos pelo peso das amostras (g) para obter o fluxo em ml/min/g de tecido.

Determinação do débito cardíaco

O débito cardíaco, expresso em ml/min, foi calculado segundo a fórmula:

$$\frac{\text{número total de microesferas injetadas (300.000)} \times \text{fluxo de referência (0,5ml/min)}}{\text{número de microesferas no sangue}}$$

número de microesferas no sangue

Determinação do índice cardíaco

O índice cardíaco foi obtido pela divisão do débito cardíaco (ml/min) pelo peso corporal (Kg) do animal, sendo expresso em ml/min/Kg.

Determinação da resistência vascular sistêmica total

A resistência vascular sistêmica total foi determinada pela divisão da pressão arterial média pelo débito cardíaco, sendo expresso em mmHg/ml/min.

4.9 Eutanásia

Após o término do protocolo experimental, cada grupo que continham um n=16 foi dividido em dois subgrupos. Os primeiros (n=8) foram eutanasiados por overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 40mg/Kg), logo após a realização da técnica de análise de fluxo pelo método de infusão de microesferas coloridas. Os segundos foram

submetidos à decapitação, para as análises histológicas do coração e músculo esquelético, além da expressão gênica no ventrículo esquerdo. Os tecidos de interesse foram dissecados e congelados em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -80°C , exceto os músculos esqueléticos que foram armazenados em nitrogênio líquido.

4.10. Avaliações Histológicas

4.10.1. Hipertrofia ventricular esquerda

Diâmetro de cardiomiócito

Para a morfometria, o coração foi retirado e mantido em solução de formol a 4% para fixação e posteriormente incluído em parafina para cortes e colorações específicos.

O ventrículo esquerdo (VE) recebeu cortes histológicos de 5 μm de espessura e foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a visualização das estruturas celulares. Dois cortes do VE para cada animal foram selecionados aleatoriamente para visualização dos cardiomiócitos em microscópio óptico utilizando objetiva 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 o sistema Quantimet (Leica). A linha traçada atravessa o centro do núcleo do miócito e com a imagem digitalizada o computador calcula a área.

Quantificação de Colágeno

Para a quantificação da fibra de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo, cortes histológicos de 5 μm de espessura foram corados com picrosirius red. Os cortes foram avaliados no sistema computadorizado de imagens (Leica Q500 iw e Leica DMLS, Leica Imaging Systems, Ltda., Cambridge, UK), com aumento de 20x. Para quantificação do colágeno cardíaco, a fração de volume de colágeno 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.

4.11 PCR Quantitativo em Tempo Real de Genes Relacionados com a Hipertrofia Cardíaca

Foram avaliada a expressão dos genes do fator natriurético atrial (ANF), α -actina esquelética, alfa miosina de cadeia pesada (α -MHC) e beta- miosina de cadeia pesada (β -MHC) conforme descrito abaixo:

4.11.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Todos os procedimentos foram realizados com materiais esterilizados e autoclavados conforme descrito por Chomczynski & Sacchi (Chomczynski, 1987). Aproximadamente 0,50 g de tecido ventricular esquerdo foi homogeneizado em 5 mL de Trizol® Reagent (*Invitrogen Life Technologies, USA*) conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo, durante 40 min a 100 V e avaliada pela intensidade das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S. A síntese de cDNA foi realizada com 2 μ g de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5 μ g/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65°C por 5 min, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 μ L contendo 3 U de RNAsin (*PROMEGA, USA*), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5 U de *SuperScript Reverse Transcriptase II* (*Invitrogen Life Technologies, USA*) pelo período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo. As reações

de *real-time* PCR foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento *ABI 7700 (Applied-Biosystems, USA)* e com o composto fluorescente *SYBR-Green I*, conforme instruções do fabricante.

4.11.2. Quantificação de RNAm por PCR quantitativo em tempo real

4.11.3. Genes relacionados com a hipertrofia cardíaca

A expressão gênica relativa para α -MHC, β -MHC, α -actina esquelética, ANFe Colágenos do tipo I e III no ventrículo esquerdo foram analisadas por reação em cadeia de polimerase em tempo real (*real-time* PCR). Os *primers* foram desenhados usando o programa *Primer 3 software* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), sendo utilizados: **ANF**: sense: 5'- CTT Cgg ggg TAg gAT TgA C-3', antisense: 5'-CTT ggg ATC TTT TgC gAT CT-3'; **α -actina esquelética**: sense: 5'-ACC ACA ggC ATT gTT CTg gA-3', antisense: 5'-TAA ggT AgT CAg TgA ggT CC-3'; **α -MHC**: sense: 5'-CgA gTC CCA ggT CAA CAA g-3', antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC C-3'; **β -MHC**: sense: 5'-CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3', antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-3'; **Ciclofilina**: sense: 5'-AAT gCT ggA CCA AAC ACA AA -3', antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3. A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da ciclofilina (DCT). A expressão gênica foi calculada usando as diferenças em valores de DCT entre as amostras (DDCT) e a equação 2^{-DDCT} .

4.12. Histoquímica para Miosina ATPase do Músculo Esquelético Sóleo

Para a avaliação dos diferentes tipos de fibras musculares e razão capilar por fibra no músculos sóleo, foi realizada por meio da técnica de histoquímica para miosina ATPase após pré-tratamento em solução com pH 10.3. O músculo foi extraído cuidadosamente, colocado pela região tendinosa em uma mistura de Tissue-Tek® com goma para manter o tecido na posição correta, em seguida, imerso em isopentano resfriado (crioprotetor que evita artefatos nas amostras) e finalmente congelado em nitrogênio líquido, onde foram mantidos até que os cortes (espessura 10 µm) fossem realizados. Após os cortes serem processados no pH 10,3, foi realizada a comparação entre as colorações obtidas segundo as observações de Hamalainen e Pette (1993) (Figura 4). A captura das imagens para análise dos diferentes tipos de fibras foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x. A análise da razão capilar por fibra foi realizada em magnificação de 400xobjetiva de 40x. O registro das imagens foi realizado em computador acoplado a um sistema de vídeo por meio de um programa de captura e análise de imagens (Leica Qwin, Bensheim-Alemanha). Para análise da área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras do músculo diafragma dos animais normotensos e hipertensos, a captura das imagens foi realizada com magnificação de 200x e objetiva de 20x.

Figura 4. Classificação dos diferentes subtipos de fibras musculares na escala de coloração atribuída para cada tipo de fibra no pH 10.3. Na cor branca as fibras do tipo I, pretas tipo IIA e na escala de cinza claro e escuro as fibras do tipo IIB e intermediária respectivamente.

4.13 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão.

Foi utilizado o teste “t” de Student para a comparação entre os grupos CTR e SHR (protocolo 1). Para análise do peso corporal foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de 1 fator para medidas repetidas e ANOVA one way seguido do Post-hoc de Bonferroni para a comparação entre os grupos SHRs (protocolos 2 e 3). Foi adotado nível de significância estatística $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Para uma melhor compreensão da influência relativa da disfunção crônica barorreflexa e quimiorreflexa nas respostas adaptativas cardíacas e músculo-esqueléticas na hipertensão arterial, optamos por apresentar os resultados em 3 protocolos (conforme descritos no quadro abaixo), avaliando: massa corporal, parâmetros morfofuncionais pelo ecocardiograma, gasometria arterial, hemodinâmica, modulação autonômica, função cardíaca de forma invasiva, adaptações morfofuncionais cardíacas por histologia, expressão gênica do ventrículo esquerdo, adaptações fenotípicas no músculo esquelético (sóleo) e fluxos sanguíneos teciduais.

PROTOCOLOS

Protocolo 1 – Caracterização do modelo experimental utilizado de hipertensão arterial (SHR);

Protocolo 2 – Influência da disfunção seletiva dos barorreceptores aórticos (SHRDA) *versus* a disfunção dos barorreceptores carotídeos (SHRDC) em animais espontaneamente hipertensos;

Protocolo 3 – Influência da disfunção dos quimiorreceptores carotídeos (SHRDC) *versus* disfunção seletiva dos quimiorreceptores carotídeos através da ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLACC) em animais espontaneamente hipertensos;

PROTOCOLO1

CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO DE

HIPERTENSÃO ARTERIAL (SHR)

No protocolo 1 será descrito os resultados voltados para a caracterização do modelo experimental utilizado, no caso animais espontaneamente hipertensos (SHR) com idade final de 18 semanas. O intuito foi mostrar que esses animais apresentam disfunções sistêmicas semelhantes às apresentadas em humanos hipertensos, que vão desde alterações do padrão ventilatório associadas às alterações cardiovasculares, a alterações músculo esqueléticas, tanto apendiculares como diafragmáticas, que em conjunto potencializam o agravamento do quadro fisiopatogênico da hipertensão arterial.

5.1 Peso corporal

A tabela abaixo ilustra o peso corporal dos animais normotensos e hipertensos estudados. Os animais SHR com 8 semanas de idade (semana 1 no protocolo) apresentaram o mesmo peso corporal em relação aos ratos Wistar da mesma idade. No entanto, ao final do protocolo (semana 10), observa-se que os animais espontaneamente hipertensos (SHR) apresentaram menor ganho de peso corporal em relação ao grupo normotenso (CTR). Ambos os grupos apresentaram ganho de peso corporal em relação aos ao seu peso inicial (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final).

Grupos	CTR	SHR
Peso inicial (g) 8ª sem	223±4	226±5
Peso final (g) 18ª sem	423±8&	289±7§&

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni (§ $p \leq 0,05$ versus CTR; & $p \leq 0,05$ versus inicial).

5.2 Avaliação ecocardiográfica

Nas variáveis morfofuncionais avaliadas através do exame de ecocardiografia (Tabela 2), observamos que o grupo SHR apresentou o tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (VEDIA) menor em relação ao grupo CTR. No entanto, nas variáveis de massa do ventrículo esquerdo corrigida (MVEcorr), encurtamento relativo da parede posterior (ERP) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEj), o grupo SHR apresentou valores estatisticamente maiores em relação ao grupo CTR. Ao

avaliarmos a velocidade de encurtamento circunferencial (VCF), relação dos índices de velocidade de relaxamento rápido e tardio do ventrículo esquerdo (Relação E/A), tempo de desaceleração da onda E (Desac. E), enchimento isovolumétrico ventricular (TRIV) e o índice de performance miocárdica (MPI), observamos que o grupo SHR foi estatisticamente maior em relação ao grupo CTR.

Tabela 2. Variáveis ecocardiográficas de morfometria e função cardíaca dos grupos normotensos (CTR) e hipertenso (SHR).

Variáveis ECO	Grupos	
	CTR	SHR
VEDIA(cm)	0,77±0,05	0,63±0,03§
MVE(g)	1,14±0,02	1,25±0,05
MVE corrigido (g/kg)	2,69±0,07	4,27±0,13§
ERP	0,39±0,04	0,64±0,04§
FEj (%)	36,50±0,62	46,73±1,93§
FE (%)	78,18±1,78	82,09±1,67
VCF (circ/sec)	0,0044±0,0001	0,00547±0,0003§
VMPicoE (m/s)	0,63±0,01	0,68±0,03
VMPicoA (m/s)	0,39±0,01	0,36±0,04
Relação E/A	1,60±0,10	2,10±0,19§
Desac. E (ms)	24,17±1,22	39,18±1,00§
TRIV(ms)	21,33±0,83	26,80±1,30§
MPI	0,33±0,02	0,43±0,03§

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise dos dados, foi utilizado o teste “t” de Student (§ p≤0,05 versus CTR).

5.3 Gasometria do sangue arterial

Para avaliar uma possível disfunção ventilatória nesses animais, realizamos a gasometria arterial para avaliar o equilíbrio ácido-básico. Os parâmetros avaliados foram: pH, pCO₂, pO₂, HCO₃ e Be.

Como podemos observar na tabela 3, os animais hipertensos apresentaram o pH elevado em relação aos animais normotensos, assim como para HCO₃ e Be. Porém no parâmetro de pCO₂ e pO₂, o grupo SHR apresentou redução.

Tabela 3. Gasometria arterial dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR).

Variáveis	Grupos	
	CTR	SHR
pH	7,42± 0,01	7,51 ± 0,01§
pCO₂(mmHg)	35,88± 0,88	32,38 ± 0,40§
pO₂(mmHg)	87,86± 1,63	72,40 ± 1,63§
HCO₃(mmol/L)	24,26± 0,60	27,06 ± 0,31§
Be(mmol/L)	-0,54± 0,70	2,38 ± 0,39§

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para análise dos dados, foi utilizado o teste “t” de Student. (§ p≤0,05 versus CTR).

5.4 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

As avaliações hemodinâmicas constaram dos registros da PAS, PAD, PAM e FC. Na tabela 4 podemos observar que os animais SHR de fato estavam hipertensos. A FC não foi diferente entre os grupos.

Tabela 4. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR).

Variáveis	Variáveis	
	CTR	SHR
PAS (mmHg)	123±2	200±3§
PAD (mmHg)	89±1	144±4§
PAM (mmHg)	104±2	172±3§
FC(bpm)	351±8	350±7

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos *foi utilizado* o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.5 Sensibilidade barorreflexa

A sensibilidade barorreflexa, avaliada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio (Figura 5), mostrou-se atenuada nos animais SHR quando comparada aos animais normotensos (CTR) tanto para as respostas bradicárdicas (SHR: $-1,06 \pm -0,19$ vs CTR: $-1,68 \pm -0,12$ bpm/mmHg), quanto para as respostas taquicárdicas (SHR: $2,92 \pm 0,14$ vs CTR: $1,33 \pm 0,15$ bpm/mmHg).

Figura 5. Respostas de bradicardia e taquicardia reflexas às variações de PA dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.6 Sensibilidade quimiorreflexa

A Figura 6 representa as respostas pressóricas e bradicárdicas às diferentes doses de KCN (20,40 e 80 μ g/Kg). No Painel A, os valores médios referentes às respostas pressóricas, apenas na dose de 20 μ g/Kg os animais hipertensos apresentaram uma resposta maior em relação aos animais normotensos (SHR: $9,55 \pm 2,21$ vs CTR: $3,95 \pm 0,89$ mmHg), não apresentando diferenças estatísticas nas doses de 40 μ g/Kg (SHR: $16,74 \pm 8,66$ vs CTR: $6,40 \pm 1,64$ mmHg) e 80 μ g/Kg (SHR: $34,76 \pm 7,72$ vs CTR: $20,80 \pm 5,89$ mmHg). Já nas respostas bradicárdicas (Painel B), os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das doses utilizadas, 20 μ g/Kg (SHR: $-7,89 \pm 1,34$ vs CTR: $-5,94 \pm 1,93$ bpm), 40 μ g/Kg (SHR: $-18,21 \pm 7,40$ vs CTR: $-8,91 \pm 1,04$ bpm) e 80 μ g/Kg (SHR: $-49,99 \pm 5,73$ vs CTR: $-76,18 \pm 19,94$ bpm).

Figura 6. Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN nas doses de 20,40 e 80 $\mu g/kg$ (i.v). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.7 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

Na variabilidade do intervalo de pulso no domínio do tempo e da frequência, observamos que a VARIP apresentou valores significativamente menores no grupo SHR bem como no % AF em relação ao grupo CTR (tabela 5).

Tabela 5: Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR).

Variáveis	Grupos (n=8)	
	CTR	SHR
SD(ms)	11,16±0,93	9,74±0,85
RMSSD(ms)	8,56±0,77	9,38±0,74
VARIP (ms²)	143,17±13,34	95,94±9,71§
% BF	18,72±3,12	24,67±2,18
% AF	81,28±2,22	75,33±2,18 §
BF/AF	0,24±0,05	0,32±0,04

Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student (§ p≤0,05 versus CTR).

O índice da modulação autonômica da variabilidade da pressão arterial sistólica, expresso pela variância total em mmHg² (VPAS) (Figura 7), foi maior no grupo SHR quando comparado ao grupo CTR (SHR: 51,57 ± 9,25 vs CTR: 12,95 ± 1,40 mmHg²).

Figura 7. Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) no grupo normotenso (CTR) e no grupo espontaneamente hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student § $p \leq 0,05$ versus CTR.

Ao avaliarmos o componente de BF da variabilidade da pressão arterial sistólica (figura 8), foi observado que o grupo SHR apresentou valores estatisticamente maiores em relação ao grupo CTR (SHR: $7,55 \pm 0,86$ vs CTR: $2,95 \pm 0,73$ mmHg²).

Figura 8. Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) no grupo normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($P \leq 0,05$) § $p \leq 0,05$ versus CTR.

O índice alfa (figura 9), também analisado através da análise espectral, indica a atividade barorreflexa espontânea. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (SHR: $1,22 \pm 0,22$ vs CTR: $1,24 \pm 0,28$ ms/mmHg).

Figura 9. Índice alfa nos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student ($P \leq 0,05$).

5.8 Controle autonômico da frequência cardíaca

A avaliação do efeito parassimpático e simpático foi através do duplo bloqueio farmacológico com atropina e propranolol, respectivamente. Na figura 10 A, os animais hipertensos (SHR) apresentaram um efeito parassimpático estatisticamente menor (SHR: $56,75 \pm 5,63$ vs. CTR: $101,25 \pm 14,02$ bpm) em relação ao grupo CTR normotenso, e em relação ao efeito simpático, os animais hipertensos apresentaram um efeito maior (SHR: $31,67 \pm 7,49$ vs. CTR: $13,95 \pm 3,02$ bpm) (Figura 10 B).

Figura 10. Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste “*t*” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.9 Avaliações invasivas da função ventricular esquerda

Medidas invasivas da função ventricular foram avaliadas através da cateterização do VE.

A figura abaixo ilustra a pressão diastólica final, a qual foi significativamente maior nos grupos hipertensos quando comparado aos seus controles normotensos (SHR: $7,20 \pm 0,32$ vs. CTR: $5,8 \pm 0,19$ mmHg).

Figura 11: Pressão diastólica final (PDF) dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.10 Aspectos morfológicos e histológicos

5.10.1 Avaliação de hipertrofia cardíaca

Na tabela 6 são expressos os resultados relacionados a alguns parâmetros morfológicos indicadores de hipertrofia cardíaca. Os dados foram corrigidos pelo comprimento da tíbia devido a este não sofrer interferência com os diferentes tratamentos ou procedimentos, o que poderia ocorrer quando corrigidos pelo a massa corporal, sub ou superestimando resultados. O grupo SHR apresentou tanto o peso do coração como o peso dos ventrículos maiores que o grupo CTR.

Tabela 6. Peso do coração e dos ventrículos corrigidos pela tíbia dos grupos normotenso (CTR) e hipertenso (SHR).

Variável	CTR	SHR
Coração/tíbia (g/cm*100)	34,8±1,1	39,9 ± 1,1§
Ventrículos/tíbia (g/cm*100)	29,5± 1,4	36,5 ± 0,8§

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student (§ p≤0,05 versus CTR).

5.10.2 Diâmetro de cardiomiócitos

O diâmetro dos cardiomiócitos, expressos em µm, foi maior nos animais hipertensos (SHR: 18,5 ± 0,6 vs. CTR: 14,2 ± 0,6 mm), indicando uma resposta hipertrófica nesses animais (Figura 12).

Figura 12: Diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos normotenso (CTR) e hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.10.3 Quantificação de colágeno

Os resultados de deposição de fibras de colágeno são expressos em percentual de colágeno analisados no VE. Na Figura 13, observa-se que os animais SHR apresentaram uma maior deposição de fibras de colágeno, sendo estatisticamente significante em relação aos animais normotensos (SHR: $10,7 \pm 1,6$ vs CTR: $0,6 \pm 0,2$ %).

Figura 13: Percentual de colágeno expresso no VE nos grupos normotenso (CTR) e hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.10.4 Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real

A expressão de alguns genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica bem estabelecida na literatura são: ANF, α -actina esquelética, assim como o aumento da expressão gênica de proteínas contráteis que codificam o sarcômero do tipo β -MHC.

Na tabela 7, podemos observar que os animais hipertensos apresentaram aumento nos marcadores de reexpressão gênica fetais, ANF e α -actina esquelética, e uma transição de fenótipos das proteínas contráteis cardíacas, ou seja, aumento da expressão do gene β -MHC e uma redução da α -MHC em relação aos animais normotensos.

Tabela 7. Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos normotenso (CTR) e hipertensos (SHR).

Expressão gênica (VE)	CTR	SHR
ANF (ua)	0,94 $\pm$ 0,12	2,10 $\pm$ 0,27§
α -actina esquelética (ua)	0,95 $\pm$ 0,11	4,59 $\pm$ 1,10§
α -MHC (ua)	1,00 $\pm$ 0,35	0,79 $\pm$ 0,03
β -MHC (ua)	0,85 $\pm$ 0,09	2,10 $\pm$ 0,27§

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.10.5 Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização

As avaliações histoquímicas foram realizadas no músculo sóleo e também no músculo diafragma, a fim de confirmar a hipótese que os SHR apresentam alterações no padrão ventilatório repercutindo em alterações morfológicas no principal músculo inspiratório.

Nas avaliações do músculo sóleo (figura 14), podemos observar que os animais hipertensos apresentaram transição no fenótipo das fibras. O grupo SHR apresentou uma redução no percentual das fibras do tipo I (SHR: $81,4 \pm 2,1$ vs. CTR: $92,1 \pm 0,4$ %), aumento do percentual das fibras do tipo II (SHR: $15,8 \pm 1,0$ vs. CTR: $7,5 \pm 1,1$ %) e um aumento também na fibras intermediárias, que significam quem são fibras que estão em transição de fenótipo (SHR: $3,8 \pm 0,9$ vs. CTR: $0,3 \pm 0,2$ %).

Figura 14. Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo dos animais normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

Ao avaliarmos a razão capilar/fibra (Figura 15), observamos que o grupo SHR apresentou uma redução do percentual em 57% em relação à média do grupo CTR (SHR: $43 \pm 0,7$ vs CTR: $100 \pm 0,2$).

Figura 15. Razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais controles (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

Também investigamos possíveis adaptações morfológicas no músculo diafragma, uma vez que esses animais apresentam uma imposição de sobrecarga funcional sobre a hemodinâmica.

Na Figura 16 pode-se observar que os animais hipertensos (SHR) apresentaram a área de secção transversal das fibras do tipo I significativamente maior em relação aos ratos normotensos (CTR). As fibras do tipo IIa não apresentaram diferenças entre os

grupos. No entanto, o diâmetro das fibras do tipo IIb foi significativamente reduzida no grupo SHR.

Figura 16. Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo diafragma de animais normotensos (CTR) e espontaneamente hipertensos (SHR). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.11 Fluxo sanguíneo regional

Através da técnica de infusão de microesferas coloridas, avaliamos o fluxo sanguíneo regional cardíaco, pulmonar, renal e músculo-esquelético (tabela 8). Observamos uma redução de fluxo sanguíneo regional no coração, rins e sóleo no grupo SHR. Não houve diferenças entre os grupos no fluxo sanguíneo pulmonar e gastrocnêmio.

Tabela 8. Fluxo sanguíneo regional dos grupos normotenso (CTR) e nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR).

Variáveis	Grupos	
	CTR	SHR
Coração (ml/min/g)	3,19±0,50	1,80±0,07§
Pulmão (ml/min/g)	1,19±0,14	1,36±0,16
Rins (ml/min/g)	3,37±0,20	1,43±0,07§
Gastrocnêmio (ml/min/g)	0,25±0,06	0,29±0,03
Sóleo(ml/min/g)	5,47±1,21	2,30±0,43§

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student ($P \leq 0,05$) § versus CTR.

5.12 Débito e índice cardíaco

O débito cardíaco e o índice cardíaco apresentaram-se reduzidos no grupo SHR quando comparado ao grupo CTR (tabela 9).

Tabela 9. Débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos de normotensos (CTR) e hipertensos (SHR).

Variáveis	Grupos	
	CTR	SHR
DC (ml/min)	106,72±7,29	74,25±12,46 §
IC (ml/min/kg)	0,34±0,02	0,27±0,09

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

5.13 Resistência vascular periférica total

A resistência vascular periférica total como esperada (figura 17), foi maior no grupo hipertenso (SHR) em relação ao grupo normotenso (CTR) (SHR: 2,61±0,35 vs. CTR: 0,95±0,08 mmHg/ml/min).

Figura 17. Resistência vascular periférica total (RVPT) nos grupos de normotensos (CTR) e hipertensos (SHR). Para a comparação entre os grupos CTR e SHR foi utilizado o teste “t” de Student (§ $p \leq 0,05$ versus CTR).

PROTOCOLO 1

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Tabela 10. Sumário dos resultados do protocolo 1. Significado dos símbolos: (●) valores semelhantes vs. CTR; (+) valores superiores vs. CTR; (-) valores inferiores vs. CTR.

VARIÁVEIS	CTR	SHR
Massa Corporal	●	-
Ecocardiografia		
VEDIA	●	-
MVE	●	●
MVE corrigido	●	+
ERP	●	+
FEj	●	+
FE	●	●
VCF	●	+
VMPicoE	●	●
VMPicoA	●	●
Relação E/A	●	+
Desac. E	●	+
TRIV	●	+
MPI	●	+
Gasometria arterial		
pH	●	+
pCO ₂	●	-
PO ₂	●	-
HCO ₃	●	+
Be	●	+
Avaliações hemodinâmicas sistêmicas		
PAS	●	+
PAD	●	+
PAM	●	+

FC	●	●
Sensibilidade barorreflexa		
Bradicardia reflexa	●	—
Taquicardia reflexa	●	—
Sensibilidade quimiorreflexa		
Δ PA (20 μ g/kg)	●	+
Modulação autonômica		
SD	●	●
RMSSD	●	●
VARIP	●	-
% BF	●	●
% AF	●	-
BF/AF	●	●
VPAS	●	+
BF PAS	●	+
Índice Alfa	●	●
Controle autonômico da FC		
Efeito Parassimpático	●	-
Efeito Simpático	●	+
Avaliações invasivas da função do VE		
PDF	●	+
Aspectos morfológicos e histológicos		
Coração/tíbia	●	+
Ventrículos/tíbia	●	+
Diâmetro de cardiomiócito	●	+
Quantificação de colágeno	●	+
PCR em tempo real		
ANF	●	+
α -actina esquelética	●	+
A-MHC	●	●
β -MHC	●	+
Distribuição percentual (%) dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo		
I	●	-

II	●	+
Intermediária	●	+
Razão capilar/fibra		
Capilar/fibra	●	-
Área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras no músculo diafragma		
I	●	+
IIa	●	●
IIb	●	-
Fluxo sanguíneo regional		
Coração	●	-
Pulmão	●	●
Rins	●	-
Gastrocnêmio	●	●
Sóleo	●	-
Débito e índice cardíaco		
DC	●	-
IC	●	●
Resistência vascular periférica		
RVP	●	+

PROTOCOLO2
INFLUÊNCIA DA DISFUNÇÃO SELETIVA DOS
BARORRECEPTORES AÓRTICOS (SHRDA) OU CAROTÍDEOS *VERSUS* A
DISFUNÇÃO COMPLETA DOS BARORRECEPTORES (SHRDSA) EM
ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Após verificarmos as adaptações provenientes da hipertensão arterial nos animais SHR, no protocolo 2 apresentaremos os resultados na mesma sequência metodológica, porém voltados para a contribuição relativa dos barorreceptores aórticos(SHRDA) ou carotídeos nas adaptações morfofuncionais cardíacas e musculoesqueléticas versus a disfunção completa dos barorreceptores (SHRDSA) em animais espontaneamente hipertensos (SHR).

5.14 Peso corporal

A tabela abaixo ilustra o peso corporal inicial e final dos animais somente hipertensos e hipertensos submetidos às diferentes desnervações. Todos os grupos apresentaram o peso corporal inicial semelhante, e ao final do protocolo os grupos também não apresentaram diferenças estatísticas. No entanto, quando comparados ao seu peso inicial, todos os grupos ganharam peso.

Tabela 11: Peso corporal dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final).

Variável	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
Peso inicial (g) 8ª sem	226±5	240±5	233±12	230±8
Peso final (g) 18ª sem	289±7&	292±5&	300±10&	286±5&

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA de medidas repetidas post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$ versus peso corporal inicial).

5.15 Avaliação ecocardiográfica

A tabela 12 apresenta os resultados das variáveis morfofuncionais avaliadas através do exame de ecocardiografia. O tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (LVDIA), a massa do ventrículo esquerdo em valores absolutos (MVE) e corrigidos (MVEcorr) e o encurtamento relativo da parede posterior (ERP) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

No entanto, a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEj%) do grupo SHRDSA foi estatisticamente maior em relação ao grupo SHR. Ao avaliarmos a fração de encurtamento do ventrículo (FE%), observamos que tanto o grupo SHRDA como o SHRDSA apresentaram valores maiores em relação ao grupo hipertenso; e o grupo SHRDSA também foi estatisticamente diferente do grupo SHRDC. Além disso, ao avaliarmos a velocidade de encurtamento circunferencial (VCFcirc/sec), os grupos SHRDA e SHRDSA apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo hipertenso.

Já no parâmetro de índice de velocidade de relaxamento rápido do ventrículo esquerdo (VMPicoE m/s) não houve diferença entre os grupos. No entanto, na velocidade de relaxamento tardio do ventrículo esquerdo (VMPicoA m/s), o grupo SHRDSA apresentou valores maiores que o grupo SHRDC, porém não observou-se diferenças entre os grupos ao realizarmos a relação desses dois índices (Relação E/A).

Na variável tempo de desaceleração da onda E (Desac. E m/s), apenas o grupo SHRDSA apresentou valores superiores em relação aos grupos SHRDA. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos no enchimento isovolumétrico ventricular (TRIV ms), porém no índice de performance miocárdica (MPI), o grupo SHRDSA apresentou valores maiores em relação ao grupo SHR e SHRDC.

Tabela 12. Variáveis ecocardiográficas de morfometria e função cardíaca dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis ECO	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
LVDIA (cm)	0,63±0,03	0,59±0,05	0,63±0,02	0,59±0,01
MVE (g)	1,25±0,05	1,27±0,05	1,23±0,04	1,28±0,02
MVE corrigido (g/kg)	4,27±0,13	4,03±0,12	4,13±0,08	4,19±0,03
ERP	0,64±0,04	0,81±0,18	0,55±0,04	0,74±0,05
FEj (%)	46,73±1,93	55,07±1,23	48,39±3,16	56,63±3,16*
FE (%)	82,09±1,67	88,91±1,13*	80,54±0,90	90,10±1,70*+
VCF (circ/sec)	0,00530±0,0002	0,00688±0,0002*	0,00579±0,0005	0,00676±0,0003*
VMPicoE(m/s)	0,68±0,04	0,66±0,07	0,58±0,04	0,67±0,03
VMPicoA(m/s)	0,36±0,04	0,31±0,06	0,28±0,03	0,43±0,03+
Relação E/A	2,10±0,19	2,21±0,18	2,13±0,13	1,60±0,09
Desac. E (ms)	39,18±1,00	36,25±0,95	38,38±2,16	44,11±1,70†
TRIV (ms)	26,80±1,30	25,80±0,49	27,25±0,79	29,00±0,63
MPI	0,43±0,03	0,48±0,03	0,42±0,02	0,60±0,07*+

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way post hoc Bonferroni (*p≤0,05 versus SHR; †p≤0,05versus SHRDA; +p≤0,05 versus SHRDC).

5.16 Gasometria do sangue arterial

Ao compararmos a gasometria arterial dos grupos hipertensos submetidos às diferentes tipos de desnervações, observamos que não houve diferenças estatísticas entre os grupos no pH e pO₂ (tabela 13). No entanto, os grupos SHRDC e SHRDSA apresentaram valores estatisticamente maiores na pCO₂ em relação aos grupos SHR e SHRDA. Nas variáveis HCO₃ e Be, os grupos SHRDC e SHRDSA apresentaram valores maiores que o grupo SHRDA.

Tabela 13. Gasometria arterial dos grupos hipertensos (SHR), hipertensocom desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
pH	7,50 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,46 ± 0,01
pCO₂(mmHg)	32,38 ± 0,40	32,50 ± 0,98	39,40 ± 1,67*†	39,61 ± 0,82*†
pO₂(mmHg)	72,40 ± 1,63	79,03 ± 2,62	69,41 ± 3,37	70,28 ± 2,89
HCO₃(mmol/L)	27,06 ± 0,31	25,14 ± 0,77	27,94 ± 0,48†	28,08 ± 0,49†
Be(mmol/L)	2,38 ± 0,39	0,27 ± 0,95	4,09 ± 0,64†	4,38 ± 0,58†

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ANOVA – One way post hoc Bonferroni. (* p≤0,05 versus SHR;† p≤0,05 versus SHRDA).

5.17 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

Nas avaliações hemodinâmicas apresentadas na tabela 14, o grupo SHRDA apresentou valores significativamente maiores quando comparado ao grupo SHR em todos os parâmetros avaliados (PAS, PAD, PAM e FC). Já o grupo SHRDC, foi estatisticamente diferente em relação ao grupo SHRDA nos parâmetros de PAS, PAD e

PAM, apresentando valores menores. E o grupo SHRDSA, foi diferente apenas em relação ao grupo SHRDA nos parâmetros de PAS e FC.

Tabela 14. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
PAS (mmHg)	200±3	212±2*	193±3†	202±2†
PAD (mmHg)	144±3	156±4*	139±2†	146±4
PAM (mmHg)	172±3	185±9*	165±2†	173±4
FC (bpm)	350±7	377±4*	351±12	334±10†

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ANOVA – One way post hoc Bonferroni. (* p≤0,05 versus SHR; † p≤0,05 versus SHRDA).

5.18 Sensibilidade Barorreflexa

Além das avaliações hemodinâmicas, avaliamos também a sensibilidade dos barorreceptores através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio (Figura 18). Nas respostas bradicárdicas, os grupos SHRDA e SHRDSA apresentaram redução em relação ao grupo SHR e ao grupo SHRDC (SHRDA: -0,45±0,07; SHRDSA: -0,28±0,03 vs. SHR: -1,06 ± -0,19 e SHRDC: -1,07±0,22 bpm/mmHg). Nas respostas

taquicárdicas, o grupo SHRDC apresentou maior resposta em relação ao grupo SHRDA (SHRDA: $0,91 \pm 0,08$ vs. SHRDC: $1,82 \pm 0,29$ bpm/mmHg); e o grupo SHRDSA apresentou uma resposta estatisticamente reduzida em relação aos grupos SHR e SHRDSA (SHRDSA: $0,56 \pm 0,05$ vs. SHR: $1,33 \pm 0,15$ bpm/mmHg; SHRDC: $1,82 \pm 0,29$ bpm/mmHg). Esses resultados confirmam a eficiência da desnervação dos barorreceptores.

Figura 18. Respostas de bradicardia e taquicardia reflexas às variações de PA dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA; + $P \leq 0,05$ versus SHRDC).

5.19 Sensibilidade Quimiorreflexa

A figura 19 representa as respostas pressóricas e bradicárdicas às diferentes doses de KCN (20, 40 e 80 μ g/Kg). No Painel A, os valores médios referentes às respostas pressóricas evidenciam que não houve diferença entre os grupos nas doses de

20µg/Kg (SHR: $9,55 \pm 2,21$; SHRDA: $12,38 \pm 2,39$; SHRDC: $15,79 \pm 2,11$ e SHRDSA: $7,91 \pm 1,89$ mmHg) e 40µg/Kg (SHR: $16,74 \pm 8,66$; SHRDA: $30,53 \pm 6,42$;SHRDC: $13,77 \pm 3,75$ e SHRDSA: $10,90 \pm 2,11$ mmHg); apenas na dose de 80 µg/Kg o grupo SHRDSA apresentou uma resposta estatisticamente menor em relação aos grupos SHRDA e SHR (SHRDSA: $11,20 \pm 0,98$ vs. SHRDA: $36,69 \pm 2,60$ e SHR: $34,76 \pm 7,72$ mmHg).

Já nas respostas bradicárdicas (Painel B), os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes nas doses de 20 µg/Kg (SHR: $-7,89 \pm 1,34$; SHRDA: $-7,09 \pm 4,94$; SHRDC: $-7,95 \pm 4,12$ e SHRDSA: $-7,88 \pm 2,81$ bpm) e 40µg/Kg (SHR: $18,21 \pm 7,40$; SHRDA: $-23,35 \pm 9,30$;SHRDC: $-14,64 \pm 2,46$ e SHRDSA: $-3,12 \pm 0,37$ bpm), porém na dose de 80 µg/Kg, o grupo SHRDSA e SHRDC apresentaram uma resposta estatisticamente menor em relação aos grupos SHRDA e SHR (SHRDSA: $-8,01 \pm 1,70$ e SHRDC: $-14,79 \pm 5,17$ vs. SHRDA: $-49,99 \pm 13,43$ e SHR: $-49,50 \pm 5,73$ bpm) (Figura 19).

Figura 19. Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN (μg/Kg, i.v) grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (*P $\leq$ 0,05 versus SHR; †P $\leq$ 0,05 versus SHRDA).

5.20 Variabilidade da Frequência Cardíaca e da Pressão Arterial

Na tabela 15, Observa-se que o SD não foi diferente entre os grupos. No entanto, na variável RMSSD o grupo SHRDA apresentou valores estatisticamente menores apenas em relação ao grupo SHR. Não houve diferenças entre os grupos nas variáveis de VARIP, %BF, %AF e BF/AF.

Tabela 15. Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
SD(ms)	9,74±0,85	9,16±0,96	9,22±0,60	9,13±1,18
RMSSD(ms)	9,38±0,74	6,71±0,83*	8,57±0,70	8,08±0,35
VARIP (ms²)	95,94±9,71	83,91±14,96	85,13±9,52	83,40±15,16
% BF	24,67±2,18	28,03±1,77	24,54±3,56	27,32±2,64
% AF	75,33±2,18	71,97±1,77	75,46±3,56	72,68 ±2,64
BF/AF	0,32±0,04	0,40±0,04	0,35±0,06	0,40±0,06

Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (*p≤0,05versus SHR).

O índice da modulação autonômica da variabilidade da pressão arterial sistólica, expresso pela variância total em mmHg² (VPAS) (Figura 20), foi maior no grupo SHRDA quando comparado ao grupo SHR e ao grupo SHRDC (SHRDA:124,03 ± 14,91 vs. SHR: 51,57 ± 9,25 e SHRDC: 55,5 ± 6,69 mmHg²). O grupo SHRDSA apresentou valores maiores em relação ao grupo SHRDC e SHR (SHRDSA:154,88 ± 15,50 vs. SHRDC: 55,5 ± 6,69 e SHR: 51,57 ± 9,25 mmHg²).

Figura 20. Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA; + $P \leq 0,05$ versus SHRDC).

Na Figura 21, observa-se o componente de BF da variabilidade da pressão arterial sistólica. O grupo SHRDA apresentou valores estatisticamente maiores em relação ao grupo SHR e ao grupo SHRDC (SHRDA: $15,82 \pm 1,61$ vs. SHR: $7,55 \pm 0,86$ e SHRDC: $8,92 \pm 1,81$ mmHg²). Grupo SHRDSA ($11,40 \pm 0,90$ mmHg²) não apresentou diferenças estatísticas em relação aos grupos.

Figura 21. Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA).

Através da análise espectral, também avaliamos o índice alfa, que tem sido aceito como um índice da atividade barorreflexa espontânea. Os grupos SHRDA e SHRDSA apresentaram valores estatisticamente menores em relação ao grupo SHR (SHRDSA: $0,58 \pm 0,14$ e SHRDA: $0,55 \pm 0,06$ vs. SHR: $1,22 \pm 0,22$ ms/mmHg). Não foram observadas diferenças estatísticas do grupo SHRDC ($0,81 \pm 0,09$ ms/mmHg) em relação aos demais grupos (Figura 22).

Figura 22. Índice alfa nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR).

5.21 Controle autonômico da frequência cardíaca

O efeito parassimpático e simpático nos grupos hipertensos submetidos ao prejuízo dos barorreceptores, foi avaliado através do duplo bloqueio farmacológico utilizando atropina e propanolol. Na Figura 23 A, observamos que o grupo SHRDA e SHRDSA apresentaram um efeito parassimpático menor em relação ao grupo SHR (SHRDA: $8,36 \pm 3,79$; SHRDSA: $26,44 \pm 7,09$ vs. SHR: $56,75 \pm 5,63$ bpm) e o grupo SHRDC foi maior em relação ao grupo SHRDA (SHRDC: $47,32 \pm 3,80$ vs. SHRDA: $8,36 \pm 3,79$ bpm).

Já no efeito simpático (Figura 23 B), o grupo SHRDA apresentou valores menores em relação ao grupo SHR e ao grupo SHRDC (SHRDA: $64,09 \pm 5,09$ vs. SHR: $31,67 \pm 7,49$ e SHRDC: $22,93 \pm 8,91$ bpm).

Figura 23. Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni. (* $P \leq 0,05$ versus SHR; [†] $P \leq 0,05$ versus SHRDA).

5.22 Avaliações invasivas da função ventricular esquerda

A pressão diastólica final (PDF) (Figura 24) avaliada através da cateterização do VE, não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHR e SHRDA e SHRDC (SHRDA: $7,14 \pm 1,08$; SHRDC: $7,21 \pm 0,72$ vs. SHR: $7,20 \pm 0,32$ mmHg), porém o grupo SHRDSA foi estatisticamente diferente em relação apenas ao grupo SHR, apresentando valores maiores (SHRDSA: $9,91 \pm 1,78$ vs. SHR: $7,20 \pm 0,32$ mmHg).

Figura 24: Pressão diastólica final (PDF) dos grupos hipertensos (SHR) e hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR).

5.23 Aspectos morfológicos e histológicos

5.23.1 Avaliação de hipertrofia cardíaca

Alguns parâmetros morfológicos indicadores de hipertrofia cardíaca são expressos na tabela 16. O peso do coração e dos ventrículos foram corrigidos pelo comprimento da tíbia. Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis cardíacas entre os grupos experimentais.

Tabela 16. Peso dos corações e ventrículos corrigidos pela tíbia dos diferentes grupos experimentais.

Variável	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
Coração/tíbia (g/cm*100)	39,8 ± 1,1	40,0 ± 1,3	42,0 ± 1,8	39,3 ± 0,6
Ventrículos/tíbia (g/cm*100)	36,5 ± 0,8	35,9 ± 1,2	37,1 ± 1,8	35,4 ± 0,6

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc Bonferroni).

5.23.2 Diâmetro de cardiomiócitos

Ao avaliarmos o diâmetro dos cardiomiócitos (mm), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (SHR: 18,5 ± 0,6; SHRDA: 17,6 ± 0,8; SHRDC: 17,0 ± 0,4; SHRDSA: 16,6 ± 0,4 mm) (Figura 25).

Figura 25: Diâmetro dos cardiomiócitos dos grupos hipertensos (SHR), hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc Bonferroni).

5.23.3 Quantificação de colágeno

Os resultados são expressos em percentual de colágeno analisados no VE. Os grupos não apresentaram diferenças significativas no percentual de colágeno no VE (SHR: $10,7 \pm 1,6$; SHRDA: $8,7 \pm 0,8$; SHRDC: $10,41 \pm 1,2$; SHRDSA: $7,4 \pm 1,3$ %) (Figura 26).

Figura 26. Percentual de colágeno expresso no VE dos grupos hipertensos (SHR), hipertensos submetidos à desnervação aórtica (SHRDA), carotídea (SHRDC) e sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc Bonferroni).

5.23.4 Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real

Ao avaliarmos a expressão de alguns genes como marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (Tabela 17), os grupos SHRDC, SHRDA e SHR não foram diferentes em nenhum dos genes avaliados. No entanto, o grupo SHRDSA apresentou valores estatisticamente menores na expressão gênica da proteína contrátil do tipo α -MHC em relação ao grupo SHR.

Tabela 17. Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Expressão gênica (VE)	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
ANF (ua)	2,10±0,27	2,06±0,28	1,81±0,66	3,35±0,48
α-actina esquelética(ua)	4,59±1,10	3,91±0,45	3,85±0,45	3,28±0,81
α-MHC(ua)	0,79±0,03	0,68±0,05	0,74±0,04	0,62±0,04*
β-MHC(ua)	2,10±0,27	2,06±0,28	1,81±0,66	3,35±0,19+

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR).

5.23.5 Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização

No protocolo 1, vimos que os animais hipertensos apresentam transição nos fenótipos das fibras. Neste protocolo 2, avaliamos a influência do prejuízo do barorreflexo nessas adaptações musculoesqueléticas. Na figura 27, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na distribuição percentual das fibras do tipo I (SHR: $81,4 \pm 2,4$; SHRDA: $81,6 \pm 1,1$; SHRDC: $86,7 \pm 2,2$; SHRDSA: $87,4 \pm 3,7\%$) e fibras do tipo II (SHR: $15,8 \pm 1,0$; SHRDA: $15,6 \pm 1,0$; SHRDC: $11,6 \pm 1,2$; SHRDSA: $15,4 \pm 4,3\%$) no músculo sóleo. No entanto, o grupo SHRDSA apresentou uma redução na distribuição percentual das fibras intermediárias em relação aos grupos SHRDA e SHR (SHRDSA: $1,0 \pm 0,3$ vs SHRDA: $3,0 \pm 0,4$ e SHR: $3,1 \pm 0,9\%$) no músculo sóleo.

Figura 27. Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo de animais espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA).

Na Figura 28, ao avaliarmos razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais hipertensos submetidos a DA, DC e DSA, observamos que os grupo SHRDA, SHRDC e SHDSA apresentaram um aumento dessa razão em 52%, 35% e 49%, respectivamente, em relação à média do grupo SHR (SHRDA: $0,95 \pm 0,09$; SHRDC: $0,84 \pm 0,06$ e SHRDSA: $0,92 \pm 0,50$ vs. SHR: $0,62 \pm 0,04\%$).

Figura 28. Razão capilar/fibra no músculo sóleo de animais espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR).

5.24 Fluxo sanguíneo regional

Na Tabela 18, observa-se o fluxo sanguíneo regional (cardíaco, pulmonar, renal e músculo- esqueléticos) nos diferentes grupos. O fluxo cardíaco não foi diferente entre os grupos. Já no fluxo pulmonar, tanto o grupo SHRDA quanto o SHRDSA apresentaram-se fluxo pulmonar diminuído em relação ao grupo SHR. Além disso, o grupo SHRDSA também foi diferente do grupo SHRDC. Não foram observadas

diferenças estatísticas entre os grupos no fluxo renal e musculoesqueléticos (gastrocnêmico e sóleo).

Tabela 18. Fluxo sanguíneo regional dos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
Coração (ml/min/g)	1,80±0,07	1,86±0,21	1,18±0,24	1,26±0,20
Pulmão (ml/min/g)	1,36±0,16	0,84±0,08*	1,00±0,14	0,52±0,11*+
Rins (ml/min/g)	1,43±0,07	1,28±0,65	1,18±0,21	0,92±0,18
Gastrocnêmio (ml/min/g)	0,29±0,03	0,44±0,12	0,31±0,04	0,44±0,05
Sóleo(ml/min/g)	2,30±0,43	4,34±0,79	4,50±1,07	2,25±0,32

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA One way - post hoc Bonferroni (* $P \leq 0,05$ versus SHR; † $P \leq 0,05$ versus SHRDA).

5.25 Débito e índice cardíaco

Nos parâmetros débito cardíaco e índice cardíaco não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 19).

Tabela 19. Débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
DC (ml/min)	74,25±12,46	76,35±8,85	70,22±12,49	65,59±7,94
IC (ml/min/kg)	0,27±0,09	0,25±0,03	0,23±0,04	0,23±0,03

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc Bonferroni).

5.26 Resistência vascular periférica total

A resistência vascular periférica total, calculada através do DC dividido pela PAM, não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (SHR: $2,61 \pm 0,35$; SHRDA: $2,94 \pm 0,22$; SHRDC: $3,34 \pm 0,23$; SHRDSA: $3,28 \pm 0,14$ mmHg/ml/min) (Figura 29).

Figura 29. Resistência vascular periférica (RVP) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA ($p \leq 0,05$ – One way post hoc bonferroni).

PROTOCOLO 2

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Tabela 20. Sumário dos resultados do protocolo 2. Significado dos símbolos (●)valores semelhantes vs. SHR; (+) valores superiores vs. SHR; (-)valores inferiores vs. SHR.

VARIÁVEIS	SHRDA	SHRDC	SHRDSA
Massa Corporal	●	●	●
Ecocardiografia			
LVDIA	●	●	●
MVE	●	●	●
MVE corrigido	●	●	●
ERP	●	●	●
FEj	●	●	+
FE	+	●	+
VCf	+	●	+
VMPicoE	●	●	●
VMPicoA	●	●	●
Relação E/A	●	●	●
Desac. E	●	●	●
TRIV	●	●	●
MPI	●	●	+
Gasometria arterial			
pH	●	●	●
pCO ₂	●	+	+
PO ₂	●	●	●
HCO ₃	●	●	●
Be	●	●	●
Avaliações hemodinâmicas sistêmicas			●
PAS	+	●	●
PAD	+	●	●
PAM	+	●	●
FC	+	●	●
Sensibilidade barorreflexa			
Bradicardia reflexa	-	●	-
Taquicardia reflexa	●	●	-

Sensibilidade quimiorreflexa			
Δ PA (80 μ g/kg)	•	•	-
Δ FC (80 μ g/kg)	•	-	-
Modulação autonômica			
SD IP	•	•	•
RMSSD	-	•	•
VARIP IP	•	•	•
%BF	•	•	•
%AF	•	•	•
BF/AF	•	•	•
VPAS	+	•	+
BFPAS	+	•	•
Índice Alfa	-	•	-
Controle autonômico da FC			
Efeito Parassimpático	-	•	-
Efeito Simpático	+	•	•
Avaliações invasivas da função do VE			
PDF	•	•	+
Aspectos morfológicos e histológicos			
Coração/tíbia	•	•	•
Ventrículos/tíbia	•	•	•
Diâmetro de cardiomiócito	•	•	•
Quantificação de colágeno	•	•	•
PCR em tempo real			
ANF	•	•	•
α -actina esquelética	•	•	•
α -MHC	•	•	-
β -MHC	•	•	•
Distribuição percentual (%) dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo			
I	•	•	•
II	•	•	•
Intermediária	•	•	-
Razão capilar/fibra			
Capilar/fibra	+	+	+
Fluxo sanguíneo regional			

Coração	•	•	•
Pulmão	-	•	-
Rins	•	•	•
Gastrocnêmio	•	•	•
Sóleo	•	•	•
Débito e índice cardíaco			
DC	•	•	•
IC	•	•	•
Resistência vascular periférica			
RVP	•	•	•

PROTOCOLO3

INFLUÊNCIA DA DISFUNÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS (SHRDC) *VERSUS* DISFUNÇÃO SELETIVA DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS (SHRLACC) E DESNERVAÇÃO SINO AÓRTICA

No protocolo 2, verificarmos a importância relativa dos barorreceptores nas adaptações morfofuncionais cardíacas e musculoesqueléticas diante da hipertensão arterial. No protocolo 3, será apresentado a importância da disfunção parcial ou total dos quimiorreceptores nessas adaptações. Para isso, utilizamos as técnicas de deservação dos quimiorreceptores carotídeos e ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo.

5.27 Peso corporal

Na tabela 21, podemos observar que os animais hipertensos, assim como observado nos outros grupos experimentais utilizados nesse trabalho, apresentaram o mesmo peso corporal com 3 meses de idade (semana 1) e ao final do protocolo. Todos os grupos apresentaram ganho de peso corporal em relação ao seu peso inicial.

Tabela 21. Peso corporal dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação aórtica (SHRDA), hipertensocom desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) na oitava semana de vida (inicial) e na décima oitava (final).

Variável	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
Peso inicial (g) 8ª sem	226±5	233±12	231±9	230±8
Peso final (g) 18ª sem	289±7&	300±10&	294±7&	286±5&

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni (& $p \leq 0,05$ versus inicial).

5.28 Avaliação ecocardiográfica

Os resultados morfofuncionais obtidos através do exame de ecocardiográfico estão expressos na tabela abaixo (Tabela 29). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros de cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (LVDIA) e na massa do ventrículo esquerdo em valores absolutos (MVE). No entanto, o MVE quando corrigido (MVE corr), o grupo SHRLA foi maior em relação ao grupo SHRDC e ao grupo SHRDSA. O grupo SHRLA, também apresentou uma maior espessura relativa da parede posterior do VE (ERP) em relação ao grupo SHRDC. Na fração de ejeção (FEj%) e de encurtamento (FE%) do ventrículo esquerdo não foram observadas diferenças entre os grupos, assim como na velocidade de encurtamento circunferencial (VCF_{circ}/sec) e no índice de velocidade de relaxamento rápido do ventrículo esquerdo (VMPicoE m/s). Em relação ao índice de velocidade de relaxamento tardio do ventrículo esquerdo (VMPicoA m/s), apenas o grupo SHRDSA foi estatisticamente maior em relação ao grupo SHRDC. No entanto, na relação desses dois índices (Relação E/A), o grupo SHRDSA foi diferente apenas do grupo SHR. No tempo de desaceleração da onda E (Desac. E m/s), o grupo SHRDSA foi maior em relação ao grupo SHRLA. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos em relação ao tempo de enchimento isovolumétrico ventricular (TRIV ms). Porém, no índice de performance miocárdica (MPI), o grupo SHRDSA foi estatisticamente maior em relação a todos os grupos.

Tabela 22. Variáveis ecocardiográficas de morfometria cardíaca dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação aórtica (SHRDSA).

Variáveis ECO	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
LVDIA (cm)	0,63±0,03	0,63±0,02	0,56±0,04	0,59±0,01
MVE (g)	1,25±0,05	1,23±0,04	1,34±0,02	1,28±0,02
MVE corrigido (g/kg)	4,27±0,13	4,13±0,08	4,61±0,11+	4,19±0,03#
ERP	0,64±0,04	0,55±0,04	0,89±0,13+	0,74±0,05
FEj (%)	46,73±1,93	48,39±3,16	58,47±4,18	56,63±3,16
FE (%)	82,09±1,67	80,54±4,33	90,82±2,17	90,10±1,70
VCF (circ/sec)	0,00547±0,0003	0,00579±0,0005	0,00697±0,0004	0,00676±0,0003
VMPicoE (m/s)	0,68±0,04	0,58±0,04	0,56±0,07	0,67±0,03
VMPicoA (m/s)	0,36±0,04	0,28±0,03	0,34±0,06	0,43±0,03+
Relação E/A	2,10±0,19	2,13±0,13	1,78±0,23	1,60±0,09*
Desac. E (ms)	39,18±1,00	38,38±2,16	36,80±1,74	44,11±1,70#
TRIV (ms)	26,80±1,30	27,25±0,79	26,33±0,84	29,00±0,63
MPI	0,43±0,03	0,42±0,02	0,41±0,05	0,60±0,07*+ #

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi utilizado ANOVA – One way post hoc Bonferroni. (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).

5.29 Gasometria do sangue arterial

Na Tabela 23, podemos observar a gasometria arterial dos diferentes grupos experimentais em relação ao seu controle hipertenso (SHR). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas variáveis de pH, pO_2 , HCO_3 e Be. Porém, todos os grupos experimentais apresentaram valores estatisticamente maiores em relação ao grupo controle (SHR) na variável de pCO_2 .

Tabela 23. Gasometria arterial dos grupos hipertensos com as diferentes desnervações: grupos controle (SHR), desnervação aórtica (SHRDA), desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
pH	7,50 $\pm$ 0,01	7,47 $\pm$ 0,01	7,47 $\pm$ 0,01	7,46 $\pm$ 0,01
pCO_2 (mmHg)	32,38 $\pm$ 0,40	39,40 $\pm$ 1,67*	38,26 $\pm$ 1,66*	39,61 $\pm$ 0,82*
pO_2 (mmHg)	72,40 $\pm$ 1,63	69,41 $\pm$ 3,37	71,83 $\pm$ 2,83	70,28 $\pm$ 2,89
HCO_3 (mmol/L)	27,06 $\pm$ 0,31	27,94 $\pm$ 0,48	27,90 $\pm$ 0,67	28,08 $\pm$ 0,49
Be (mmol/L)	2,38 $\pm$ 0,39	4,09 $\pm$ 0,64	4,03 $\pm$ 0,96	4,38 $\pm$ 0,58

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA – One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).

5.30 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas

Nas avaliações hemodinâmicas de PAS, PAD, PAM e FC não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 24).

Tabela 24. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos ratos espontaneamente hipertensos dos grupos controle (SHR), desnervação aórtica (SHRDA), desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
PAS (mmHg)	200±3	193±3	202±5	202±2
PAD (mmHg)	144±4	139±2	142±3	146±4
PAM (mmHg)	172±3	165±2	171±3	173±4
FC(bpm)	350±7	351±12	343±8	334±10

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. (ANOVA – One way post hoc Bonferroni).

5.31 Sensibilidade barorreflexa

Na figura 30, podemos observar as respostas bradicárdicas e taquicárdicas dos grupos SHR, SHRDC, SHRLA e SHRDSA quando submetidos à infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio para avaliar a sensibilidade dos barorreceptores. Apenas o grupo SHRDSA foi estatisticamente diferente em relação a todos os grupos, tanto nas respostas bradicárdicas (SHRDSA: $-0,28 \pm 0,03$ vs. SHR: $-1,06 \pm 0,19$; SHRDC: $-1,07 \pm 0,22$; SHRLA: $-1,15 \pm 0,15$ bpm/mmHg), quanto para as respostas taquicárdicas (SHRDSA: $0,56 \pm 0,05$ vs. SHR: $1,33 \pm 0,15$; SHRDC: $1,82 \pm 0,29$; SHRLA: $1,62 \pm 0,10$ bpm/mmHg).

Figura 30. Respostas de taquicardia e bradicardia reflexas às variações de PA dos grupos controle (SHR), SHR com desnervação aórtica (SHRDA), SHR com desnervação carotídea (SHRDC), SHR com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e SHR com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).

5.32 Sensibilidade quimiorreflexa

A figura 31 representa as respostas pressoras e bradicárdicas às diferentes doses de KCN (20, 40 e 80 $\mu\text{g/Kg}$). No Painel A, são apresentados os valores médios referentes às respostas pressóricas; não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas doses de 20 $\mu\text{g/Kg}$ (SHR: $9,55 \pm 2,21$; SHRDC: $15,79 \pm 2,11$ e SHRLA: $11,15 \pm 3,47$ e SHRDSA: $7,91 \pm 1,89$ mmHg) e 40 $\mu\text{g/Kg}$ (SHR: $16,74 \pm 8,66$; SHRDC: $13,77 \pm 3,75$; SHRLA: $11,86 \pm 2,27$ e SHRDSA: $10,90 \pm 2,11$ mmHg). No entanto, na dose de 80 $\mu\text{g/Kg}$ o grupo SHRDSA foi estatisticamente menor em relação ao grupo SHR (SHRDSA: $11,20 \pm 0,98$ vs. SHR: $34,76 \pm 7,72$ mmHg).

Já nas respostas bradicárdicas (Painel B), os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na dose de 20 $\mu\text{g/Kg}$ (SHR: $-7,89 \pm 1,34$; SHRDC: $-7,95 \pm 4,12$; SHRLA: $-1,32 \pm 4,46$ e SHRDSA: $-7,88 \pm 2,81$ bpm). Na dose de 40 $\mu\text{g/Kg}$ o grupo SHRLA apresentou uma resposta bradicárdica estatisticamente menor em relação ao grupo SHRDC e SHR (SHRLA: $5,45 \pm 3,79$ vs. SHRDC: $14,64 \pm 2,64$ e SHR: $18,21 \pm 7,40$ bpm) e na dose de 80 $\mu\text{g/Kg}$, todos os grupos experimentais apresentaram respostas bradicárdicas significativamente menores em relação ao grupo SHR (SHRDSA: $-8,01 \pm 1,70$; SHRDC: $-14,79 \pm 5,17$; SHRLA: $6,10 \pm 7,37$ vs. SHR: $-49,50 \pm 5,83$ bpm).

Figura 31. Variações da pressão arterial (painel A) e frequência cardíaca (painel B) em resposta à infusão de KCN ($\mu\text{g/Kg}$, i.v) nos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).

5.33 Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma das variáveis da variabilidade da FC (Tabela 25).

Tabela 25. Variabilidade do intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertenso (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
SD(ms)	9,74±0,85	9,22±0,60	9,49±0,54	9,13±1,18
RMSSD(ms)	9,38±0,74	8,57±0,70	8,42±0,73	8,08±0,35
VARIP (ms²)	95,94±9,71	85,13±9,52	92,70±9,97	83,40±15,16
% BF	24,67±2,18	24,54±3,56	23,64±2,90	27,32±2,64
% AF	75,33±2,18	75,46±3,56	76,36 ±2,90	72,68 ±2,64
BF/AF	0,32±0,04	0,35±0,06	0,33±0,05	0,40±0,06

Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Com relação ao índice da modulação autonômica da variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância total em mmHg² (VPAS), apenas o grupo SHRDSA foi estatisticamente maior em relação a todos os grupos (Figura 32) (SHRDSA: $154,88 \pm 15,50$ vs. SHRLA: $70,09 \pm 7,90$; SHRDC: $55,50 \pm 6,69$ e SHR: $51,57 \pm 9,25$ mmHg²).

Figura 32. Variabilidade da pressão arterial sistólica expresso pela variância (VPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).

No componente de BF da variabilidade da pressão arterial sistólica (Figura 33), não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (SHR: $7,55 \pm 0,86$; SHRDC: $8,92 \pm 1,81$; SHRLA: $11,33 \pm 1,70$ e SHRDSA: $11,40 \pm 0,90$ mmHg²).

Figura 33. Componente de modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica (BFPAS) nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).

Na Figura 34, a sensibilidade barorreflexa espontânea, avaliada através da análise espectral, foi estatisticamente menor no grupo SHRDSA em comparação ao grupo SHR (SHRDSA: $0,58 \pm 0,14$ vs SHR: $1,22 \pm 0,22$ ms/mmHg).

Figura 34. Índice alfa nos grupos espontaneamente hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One waypost hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).

5.34 Controle autonômico da frequência cardíaca

Na Figura 35 A, os grupos SHRLA e SHRDSA apresentaram valores estatisticamente menores de efeito parassimpático em relação ao grupo SHR (SHRDSA: $26,44 \pm 7,09$; SHRLA: $29,68 \pm 8,77$ vs. SHR: $56,75 \pm 5,63$ bpm).

No painel 35 B, o efeito simpático foi maior no grupo SHRDSA em relação aos grupos SHRDC e SHRLA (SHRDSA: $53,95 \pm 7,03$ vs. SHRDC: $22,93 \pm 8,91$; SHRLA: $20,50 \pm 2,28$ bpm).

Figura 35. Efeito parassimpático (A) e simpático (B) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC).

5.35 Avaliações invasivas da função ventricular esquerda

Na pressão diastólica final (PDF) avaliada através da cateterização do VE (Figura 36), o grupo SHRDSA apresentou valores estatisticamente maiores em relação a todos os grupos (SHRDSA: $9,91 \pm 1,78$ vs. SHRLA: $6,03 \pm 0,45$; SHRDC: $7,21 \pm 0,84$; SHR: $7,20 \pm 0,32$ mmHg),

Figura 36. Pressão diastólica final (PDF) nos grupos hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; + $p \leq 0,05$ versus SHRDC; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).

5.36 Aspectos morfológicos e histológicos

5.36.1 Avaliação de hipertrofia cardíaca

Na Tabela 26 são expressos os resultados relacionados a alguns parâmetros morfológicos indicadores de hipertrofia cardíaca corrigidos pelo comprimento da tíbia. Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis cardíacas entre os grupos experimentais SHRs.

Tabela 26. Peso dos corações e ventrículos corrigidos pela tíbia dos diferentes grupos experimentais submetidos a diferentes desnervações.

Variável	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
Coração/tíbia (g/cm*100)	39,8 ± 1,1	42,0 ± 1,8	39,7 ± 1,3	39,3 ± 0,6
Ventrículos/tíbia (g/cm*100)	36,5 ± 1,2	37,1 ± 1,8	37,2 ± 2,8	35,4 ± 0,6

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).

5.36.2 Diâmetro de cardiomiócitos

Não foram observadas diferenças significativas nos valores dos diâmetros dos cardiomiócitos entre os grupos (SHR: 18,5±0,6; SHRDC: 18,5±0,6; SHRLA: 18,9±0,7 e SHRDSA: 16,6 ± 0,4 mm) (Figura 37).

Figura 37. Diâmetro dos cardiomiócitos (mm) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA-One way post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).

5.36.3 Quantificação de colágeno

Os resultados são expressos em percentual de colágeno analisados no VE (Figura 38). Os grupos não apresentaram diferenças significativas (SHR: $10,7 \pm 1,6$; SHRDC: $10,4 \pm 1,2$; SHRLA: $9,9 \pm 1,3$ e SHRDSA: $7,4 \pm 1,3$ %).

Figura 38. Percentual de colágeno expresso no VE nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC) e hipertensos com ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo (SHRLA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA-One waypost hoc Bonferroni($P \leq 0,05$).

5.36.4 Marcadores de hipertrofia cardíaca patológica - PCR em Tempo Real

Nas análises de expressão gênica relacionadas à hipertrofia patológica, apenas a expressão do gene α -MHC foi estatisticamente menor no grupo SHRDSA em relação ao grupo SHR (Tabela 27).

Tabela 27. Expressão gênica de marcadores patológicos de hipertrofia cardíaca nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertensos com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Expressão gênica (VE)	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
ANF (ua)	2,10±0,27	1,81±0,66	2,08±0,71	3,35±0,48
α-actina esquelética (ua)	4,59±1,10	3,85±0,45	3,81±1,23	3,28±0,81
α-MHC (ua)	0,79±0,03	0,74±0,04	0,79±0,14	0,62±0,04*
β-MHC (ua)	2,10±0,27	1,81±0,66	3,11±0,71	3,35±0,19

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* p ≤ 0,05 versus SHR).

5.36.5 Determinação do fenótipo das fibras musculares e capilarização

Ao avaliarmos a distribuição percentual dos diferentes tipos de fibras nos animais submetidos ao prejuízo do quimiorreflexo (Figura 39), observamos que não houve diferenças estatísticas na distribuição percentual das fibras do tipo I (SHR: 81,4 ± 2,4; SHRDC: 86,7 ± 2,2; SHRLA: 87,1 ± 3,7% e SHRDSA: 87,4 ± 3,7%) e nas fibras do tipo II (SHR: 15,8 ± 1,0; SHRDC: 11,6 ± 1,2; SHRLA: 12,5 ± 1,2 e SHRDSA: 15,4 ± 4,3%) no músculo sóleo. Porém, nas fibras intermediárias o grupo SHRDSA apresentou valores estatisticamente menores em relação ao grupo SHR (SHRDSA: 1,0 ± 0,3 vs .SHR: 3,1 ± 0,9%).

Figura 39. Distribuição dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo nos grupos hipertenso (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One waypost hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).

A razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais hipertensos submetidos ao prejuízo dos quimiorreceptores (SHRDC, SHRLA e SHRDSA) apresentaram um aumento dessa razão em 35%, 50% e 49%, respectivamente, em relação à média do grupo SHR (SHRDC; $0,84 \pm 0,06$; SHRLA: $0,84 \pm 0,12$ e SHRDSA: $0,92 \pm 0,50$ vs. SHR: $0,62 \pm 0,04$) (Figura 40).

Figura 40. Razão capilar/fibra no músculo sóleo dos animais espontaneamente hipertensos (SHR) com desnervação carotídea (SHRDC), ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA- One way post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).

5.37 Fluxo sanguíneo regional

Na tabela 28, observa-se que não houve diferenças estatísticas entre os grupos ao avaliarmos o fluxo sanguíneo regional cardíaco, renal e músculo- esqueléticos. No entanto, o fluxo sanguíneo pulmonar no grupo SHRDSA foi estatisticamente menor em relação aos grupos SHR e SHRLA.

Tabela 28. Fluxo sanguíneo regional no grupo hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
Coração (ml/min/g)	1,80±0,07	1,18±0,24	1,39±0,18	1,26±0,20
Pulmão (ml/min/g)	1,36±0,16	1,00±0,14	1,19±0,20	0,52±0,11*#
Rins (ml/min/g)	1,43±0,07	1,18±0,21	1,55±0,32	0,92±0,18
Gastrocnêmio (ml/min/g)	0,29±0,03	0,31±0,04	0,41±0,14	0,44±0,05
Sóleo(ml/min/g)	2,30±0,43	4,50±1,07	2,34±0,35	2,25±0,32

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR; # $p \leq 0,05$ versus SHRLA).

5.38 Débito e índice Cardíaco

Na Tabela 29, podemos observar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos, tanto no débito cardíaco como no índice cardíaco.

Tabela 29. Débito cardíaco e do índice cardíaco no grupo hipertensos (SHR), hipertenso com desnervação carotídea (SHRDC), hipertenso com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA).

Variáveis	SHR	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
DC (ml/min)	74,25±12,46	70,22±12,49	59,99±12,67	65,59±7,94
IC (ml/min/kg)	0,27±0,09	0,23±0,04	0,20±0,04	0,23±0,03

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação dos grupos hipertensos, foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni ($p \leq 0,05$).

5.39 Resistência vascular periférica total

Na Figura 41, o grupo SHRLA apresentou valores estatisticamente maiores de resistência vascular periférica total apenas em relação ao grupo SHR. (SHRLA: 5,03±0,66 vs. SHR: 2,61±0,35 mmHg/ml/min).

Figura 41. Resistência vascular periférica total (RVPT) nos grupos hipertensos (SHR), hipertensos com desnervação carotídea (SHRDC), hipertensos com ligadura da artéria do corpúsculo carotídeo (SHRLA) e hipertenso com desnervação sinoaórtica (SHRDSA). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para a comparação entre os grupos foi utilizado ANOVA – One way- post hoc Bonferroni (* $p \leq 0,05$ versus SHR).

PROTOCOLO 3

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Tabela 30. Sumário dos resultados do protocolo 3. Significado dos símbolos: (●) valores semelhantes vs. SHR; (+) Valores superiores vs. SHR; (-) Valores inferiores vs. SHR.

VARIÁVEIS	SHRDC	SHRLA	SHRDSA
Massa Corporal	●	●	●
Ecocardiografia			
LVDIA	●	●	●
MVE	●	●	●
MVE corrigido	●	●	●
ERP	●	●	●
FEj	●	●	●
FE	●	●	●
VCF	●	●	●
VMPicoE	●	●	●
VMPicoA	●	●	●
Relação E/A	●	●	-
Desac. E	●	●	●
TRIV	●	●	●
MPI	●	●	+
Gasometria arterial			
pH	●	●	●
pCO ₂	+	+	+
PO ₂	●	●	●
HCO ₃	●	●	●
Be	●	●	●
Avaliações hemodinâmicas sistêmicas			
PAS	●	●	●
PAD	●	●	●
PAM	●	●	●
FC	●	●	●

Sensibilidade barorreflexa			
Bradicardia reflexa	•	•	-
Taquicardia reflexa	•	•	-
Sensibilidade quimiorreflexa			
Δ PA (80 μ g/kg)	•	•	-
Δ FC (40 μ g/kg)	•	-	-
Δ FC (80 μ g/kg)	-	-	-
Modulação autonômica			
SD	•	•	•
RMSSD	•	•	•
VARIP	•	•	•
%BF	•	•	•
%AF	•	•	•
BF/AF	•	•	•
VPAS	•	•	+
BFPAS	•	•	•
Índice Alfa	•	•	-
Controle autonômico da FC			
Efeito Parassimpático	•	-	-
Efeito Simpático	•	•	•
Avaliações invasivas da função do VE			
PDF	•	•	+
Aspectos morfológicos e histológicos			
Coração/tíbia	•	•	•
Ventrículos/tíbia	•	•	•
Diâmetro de cardiomiócito	•	•	•
Quantificação de colágeno	•	•	•
PCR em tempo real			
ANF	•	•	•
α -actina esquelética	•	•	•
α -MHC	•	•	-
β -MHC	•	•	•
Distribuição percentual (%) dos diferentes tipos de fibras no músculo sóleo			
I	•	•	•
II	•	•	•

Intermediária	•	•	-
Razão capilar/fibra			
Capilar/fibra	+	+	+
Fluxo sanguíneo regional			
Coração	•	•	•
Pulmão	•	•	-
Rins	•	•	•
Gastrocnêmio	•	•	•
Sóleo	•	•	•
Débito e índice cardíaco			
DC	•	•	•
IC	•	•	•
Resistência vascular periférica			
RVP	•	+	•

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Na busca da melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas adaptações morfofuncionais crônicas observadas na hipertensão, objetivou-se no presente trabalho verificar a importância do barorreflexo e quimiorreflexo através da desnervação completa e seletiva dos barorreceptores e quimiorreceptores no controle neurogênico da circulação mediando respostas crônicas cardíacas e periféricas.

Tal proposta baseou-se no interesse em conhecer a participação relativa de cada grupo de receptores (aórticos e carotídeos) em animais hipertensos no controle da PA, FC e ainda nas adaptações periféricas à hipertensão associada ou não à desnervação seletiva. A motivação para esse estudo surgiu de resultados prévios de nosso grupo, que vem demonstrando a importância da integridade do barorreflexo para as adaptações neurogênicas mediadas pelo treinamento físico (MORAES-SILVA et al., 2010) na determinação de disfunção diastólica (MOSTARDA et al., 2011), na mortalidade após infarto agudo do miocárdio (MOSTARDA et al., 2010) e no remodelamento cardíaco (PIRATELLO et al., 2010). Em todos esses trabalhos, entretanto, não ficou clara a importância relativa dos baro e/ou dos quimiorreceptores nesses achados, visto que a desaferentação sinoaórtica (usada como modelo de disfunção dos barorreceptores) inclui a desnervação de ambos os grupos de receptores.

Diante disso, trabalhamos com 6 grupos de animais, 1 grupo normotenso e 5 grupos hipertensos, conforme descrito nos métodos.

Para melhor compreensão, dividimos a discussão em dois tópicos.

- **Adaptações sistêmicas na hipertensão arterial;**
- **Influência relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores nas adaptações morfofuncionais cardíacas e periféricas na hipertensão arterial**

6.1 Adaptações sistêmicas na hipertensão arterial

A HA por ser um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de importantes manifestações clínicas cardiovasculares ([VI Brazilian Guidelines on Hypertension], 2010), tem motivado o estudo por diversos grupos de pesquisa que utilizando modelos experimentais de HA, encontram-se em uma busca extenuante pela compreensão dos fatores relacionados à sua fisiopatologia.

Neste trabalho, utilizamos um modelo genético de hipertensão espontânea (SHR) que apresenta respostas hemodinâmicas, neurais, vasculares e lesões de órgãos-alvo semelhantes à hipertensão primária humana (SEALS et al., 1994; SHARMA et al., 1985; TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Esse modelo foi desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963) através de meticolosas reproduções utilizando esquemas de retrocruzamento envolvendo irmãos e irmãs de ratos da linhagem Wistar Kyoto que apresentavam pressão arterial elevada, resultando em animais naturalmente hipertensos em 100 % dos seus descendentes (OKAMOTO et al., 1966). Diante disso, o modelo SHR é amplamente utilizado e considerado uma excelente ferramenta para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da hipertensão arterial (SALGADO et al., 2007).

Como controle dos ratos SHR, optamos em nosso estudo pelo uso de animais da linhagem Wistar, devido ao fato de que ratos Wistar-Kyoto já apresentam alterações hemodinâmicas e metabólicas, e mesmo em estado de normotensão poderiam desenvolver hipertrofia ventricular, um dos objetivos do nosso estudo (KURTZ; MORRIS, 1987). Ressalte-se que diversos estudos da literatura utilizam ratos Wistar como controles dos ratos SHR (ORLOWSKI et al., 2013; FLUES et al., 2012; (ABDALA et al., 2012; PIRATELLO et al., 2010).

A disfunção autonômica, também presente em pacientes hipertensos (ANDERSON et al., 1989; ESLER et al., 2001; SMITH et al., 2004), é apontada como um importante fator neural no desenvolvimento da HA no modelo SHR, que por sua vez está associado com o aumento da resistência periférica total e alterações cardiocirculatórias como hipertrofia cardíaca e rarefação capilar periférica (FROHLICH; PFEFFER, 1975; JUDY; FARRELL, 1979; LUNDIN; RICKSTEN; THOREN, 1984; MORRISON; WHITEHORN, 1982). De fato, através dos nossos achados autonômicos (tabela 5, figuras 7 e 8), ecocardiográficos (tabela 2) e histológicos (tabela 6, figuras 12 e 13) verificamos não somente a disautonomia, mas também aumento da massa ventricular esquerda paralelamente ao aumento da deposição de colágeno e diâmetro dos cardiomiócitos.

O remodelamento cardíaco na HA é uma resposta adaptativa à sobrecarga funcional imposta ao coração (BING et al., 1995), podendo ser ocasionada por influências múltiplas e não decorrente exclusivamente dos elevados níveis pressóricos. De fato, Rizzoni et al. (1992) demonstrou em pacientes hipertensos uma baixa correlação entre a ocorrência de hipertrofia ventricular e as medidas isoladas de pressão arterial.

Independente das múltiplas influências, a hipertrofia cardíaca é acompanhada por mudanças na expressão gênica local. Em roedores, o aumento da expressão de proteínas contráteis no ventrículo como α -actina esquelética e β -MHC, assim como o aumento da expressão gênica do ANF, normalmente expressos durante o desenvolvimento embrionário, são indicativos de hipertrofia cardíaca patológica (DONALDSON et al., 2012; VIKSTROM et al., 1998). Alterações na composição de proteínas contráteis do coração ocasionam adaptações anormais na capacidade contrátil miocárdica, que em estágios avançados pode culminar em insuficiência cardíaca

(OLIVEIRA; KRIEGER, 2002). O aumento da expressão de ANF nos ventrículos tem sido documentado em modelos de hipertrofia e insuficiência cardíaca (BOLUYT et al., 1994; FELDMAN et al., 1993; FUKUI et al., 1989; MATSUBARA et al., 1990) , assim como também observado em nosso protocolo (tabela 7). Vale ressaltar que estudos apontam o aumento do ANF como um meio de reduzir a sobrecarga funcional através das suas propriedades natriuréticas e vasodilatadoras (ROSENZWEIG; SEIDMAN, 1991) . Portanto, o aumento dos níveis de ANF nos ventrículos tem sido apontado como um importante marcador molecular de hipertrofia (SADOSHIMA et al., 1992) .

Embora as adaptações morfofuncionais cardíacas sejam mais evidentes na HA, atualmente, também tem sido descrito na literatura importantes modificações estruturais e funcionais periféricas, como transição de fenótipo e rarefação capilar no músculo esquelético (BORTOLOTTI et al., 1999; FERNANDES et al., 2012; HERNANDEZ et al., 1999). Adicionalmente, existem descrições de que os animais SHR quando comparados aos WKY, apresentam rarefação capilar tanto no músculo gracilis como no miocárdio e uma aumentada razão parede/lúmen do músculo gracilis. Essas adaptações poderiam estar contribuindo para a manutenção da hipertensão arterial nesses animais (AMARAL et al., 2001). Nossos resultados estão de acordo com a literatura (figuras 14 e 15) e, além disso, também observamos uma redução do fluxo sanguíneo no músculo sóleo (tabela 8). Esses achados podem ser justificados através da hiperatividade simpática, documentada tanto em humanos quanto em animais, juntamente com anormalidades vasculares, que consistem no espessamento da artéria e estreitamento do lúmen (SABBATINI; VEGA; AMENTA, 1996; ESLER, 2000), o que poderia repercutir também em alterações fenotípicas das fibras musculares.

Além das adaptações morfofuncionais avaliadas no músculo sóleo, também investigamos adaptações no músculo diafragma. Uma vez que mudanças no balanço autonômico, por meio da interação entre os sistemas simpático e parassimpático, produzem variações na FC, PA (MORAES-SILVA et al, 2010) e no padrão e ritmo ventilatório (NOVAK et al., 1994).

Através da gasometria arterial (tabela 3), os animais SHR parecem ter apresentado mudanças no padrão respiratório que sugerem hiperventilação hiperventilação. Do mesmo modo, estudos com pacientes hipertensos têm demonstrado que o desenvolvimento e agravamento da HA estão relacionados com a modificação do padrão e ritmo respiratório, com e sem desenvolvimento de apneia obstrutiva do sono (JOSEPH et al., 1998). Mudanças no padrão respiratório, tendendo à hiperventilação intercalados com períodos de hipopnéia modifica a demanda muscular, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento de alterações estruturais no músculo diafragma, como já descrito na insuficiência cardíaca (LINDSAY et al., 1996), porém demonstrados pela primeira vez no presente trabalho em animais SHR. Além disso, as mudanças no padrão respiratório na HA apresentam uma relação com a modificação de componentes de controle autonômico cardiovascular (sensibilidade do quimiorreflexo e modulação simpática da PA) (figura 6), e que contribuem para aumento e manutenção dos níveis de PA (IRIGOYEN et al., 2001; CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

O diafragma é o músculo mais relevante no processo de inspiração em mamíferos, por conta disso, talvez possa ser o mais acometido pelo seu papel na capacidade ventilatória. A perda de massa muscular diafragmática tem sido demonstrada em várias condições experimentais como ventilação mecânica (POWERS,

S. K.; KAVAZIS; LEVINE, 2009) e hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina (DE MAN et al., 2012).

No entanto, nestes modelos supramencionados, a atrofia ocorre tanto em fibras oxidativas como em glicolíticas, contrariamente ao observado em nosso estudo (figura 16), nos quais observamos atrofia apenas em fibras do tipo IIB. Nós especulamos que o aumento da área de secção transversa das fibras do tipo I (oxidativas) em detrimento da redução das fibras do tipo IIB (glicolíticas) em SHR, ocorra devido a uma possível adaptação a mudanças no padrão ventilatório, provavelmente como uma tentativa de melhorar a resistência ventilatória impedindo o desenvolvimento de fadiga, o que contrasta com as alterações observadas no músculo esquelético apendicular de SHR (BORTOLOTTI et al., 1999; GRAY, 1988) que por sua vez depende do balanço entre a síntese e degradação de proteínas, e em especial, ao sistema proteolítico ubiquitina proteassoma (SUP). A SUP é uma importante via proteolítica responsável pela eliminação de proteínas danificadas e turnover de proteínas no músculo esquelético (HESS et al., 2007) sendo observado aumento de sua atividade em diferentes modelos de miopatia diafragmática (HESS et al., 2007; POWERS, G. L. et al., 2010). Esses achados estão de acordo com a literatura, uma vez que o desequilíbrio redox pode modular diretamente a oxidação de proteínas, que são substratos para o SUP (BETTERS et al., 2004; JUNG et al., 2009; ZERGEROGLU et al., 2003). Reforçando essa hipótese, observamos também uma correlação linear positiva entre a atividade do SUP e os níveis de peroxidação lipídica ($r = 0,6$ $p < 0,05$).

Diante desses resultados do protocolo 1, observamos que ratos SHR com 18 semanas já apresentam alterações hemodinâmicas, autonômicas, bem como prejuízo no mecanismo reflexo a curto prazo da PA, remodelamento cardíaco e alterações estruturais na musculatura esquelética. E que as adaptações diafragmáticas até então

inéditas na literatura em ratos SHR, apontam um aumento da demanda funcional, como aumento da frequência ventilatória (embora não tenhamos realizado essa medida). E que medidas de intervenção, como treinamento da musculatura inspiratória, poderiam ser conduzidas já nos períodos iniciais de HA na tentativa de evitar a extensão de prejuízos estruturais e funcionais na musculatura esquelética.

6.2 Influência relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores nas adaptações morfofuncionais cardíacas e periféricas na hipertensão arterial

Após observar as adaptações sistêmicas decorrentes da hipertensão arterial, investigamos a influência relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores nessas adaptações através do modelo de DSA e desnervações seletivas desses receptores.

As implicações mais importantes do estudo são de que os barorreceptores arteriais apresentam predominantemente uma maior influência sobre o controle da PA, assim como do componente simpático para o coração e periferia, repercutindo em maiores adaptações nos grupos hipertensos com DA e DSA. Em contraste, o grupo hipertenso, com prejuízo induzido da função dos quimiorreceptores carotídeos, contrariando nossa hipótese, não alterou a PA significativamente, mas provavelmente cursou com maior influência sobre a ventilação.

Os prejuízos cardiovasculares observados através da cirurgia de desnervação sinoaórtica (DSA) tem sido extensamente estudado em diversos modelos experimentais (BISHOP et al., 1987; COWLEY; LIARD; GUYTON, 1973; FERRARIO; MCCUBBIN; PAGE, 1969; FLUES et al., 2012, PIRATELLO et al., 2010) e como característica unânime em todos esses estudos encontrou-se o aumento relevante da variabilidade da pressão arterial, que sabemos, tem sido associado com lesões de órgãos alvo. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliaram os efeitos isolados da denervação aórtica e carotídea nessas adaptações.

Nosso grupo já demonstrou em ratos normotensos o aumento agudo da PA após a secção somente das fibras depressoras aórticas, comportamento este não observado quando realizado a denervação seletiva do seio carotídeo (KRIEGER, 1964; 1970). O conceito de que há uma predominância dos barorreceptores aórticos sobre os

carotídeos na regulação da pressão arterial em ratos foi confirmado através do estudo da regulação da FC (KRIEGER, 1984). A dernervação aórtica isolada produziu taquicardia similar aos animais submetidos à DSA, ao passo que a dernervação carotídea produziu somente um ligeiro, porém não significativo aumento da FC. Em revisão sobre o assunto, Franchini e Krieger (1994) chegaram a propor, baseados em evidências funcionais que a desnervação aórtica teria os efeitos da desnervação dos barorreceptores aórticos e que a desnervação carotídea seria o reflexo da desnervação dos quimiorreceptores carotídeos, sinalizando para o efeito predominante dos barorreceptores aórticos no controle da PA e da atividade simpática periférica.

Em nossos achados utilizando ratos espontaneamente hipertensos observamos aumento de 13 mmHg da PA do grupo SHRDA em relação ao grupo SHR (tabela 14). Entretanto, a desnervação carotídea no grupo SHRDC, não provocou resultados semelhantes aos observados previamente em animais normotensos por Franchini e Krieger (1992), que demonstraram redução sustentada da PAM.

Esse resultado chamou muito nossa atenção, visto que na literatura, não só este mesmo procedimento em animais normotensos promoveu queda sustentada da PA (FRANCHINI; KRIEGER, 1992), como trabalho recente do grupo do Prof. Patton demonstrou redução da PAM após desnervação carotídea em SHR (ABDALA et al., 2012). Dessa forma, entendíamos até o momento que os quimiorreceptores poderiam exercer uma influência tônica sobre os níveis pressóricos, sendo determinantes para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão neurogênica, estando sua retirada diretamente ligada com uma resposta hipotensiva sustentada (FRANCHINI; KRIEGER, 1992). Embora o conceito de que exista uma influência tônica da atividade dos quimiorreceptores levando ao aumento da atividade simpática periférica seja verdadeiro (IRIGOYEN et al., 1991), não encontramos redução da PA após desnervação seletiva

dos quimiorreceptores ou ligadura da artéria do corpo carotídeo. Outras interferências como o registro realizado em animais acordados, pode ter contribuído para não encontrarmos essa redução.

Ainda dentro desse contexto, no presente estudo utilizamos animais SHR, e é possível que os efeitos da DSA e das desnervações seletivas sejam diferentes nesses animais em comparação aos normotensos, uma vez que na literatura resultados controversos são encontrados com relação aos efeitos da desnervação de aferentes. De fato, o estudo realizado por Cruz et al. (2013) utilizando ratos SHR também com 18 semanas de idade submetidos a desnervação dos quimiorreceptores, de forma similar não observaram queda da PA. Diante disso, embora se espere redução sustentada da PA após desnervação carotídea frente à função excitatória tônica exercida pelos quimiorreceptores arteriais, ainda se encontra na literatura resultados diferentes, que relatam queda ou nenhuma mudança na PA (ABDALA et al., 2012; CRUZ et al., 2013).

Após observar as respostas hemodinâmicas, avaliamos a sensibilidade barorreflexa dos diferentes grupos. Nos grupos hipertensos, a resposta bradicárdica do grupo SHRDA foi menor em relação ao grupo SHR, o que evidencia a desnervação dos receptores aórticos e confirma dados da literatura que mostraram que os barorreceptores aórticos tem uma ação inibitória tônica sobre o simpático periférico (figura 18) (FINK et al., 1981; BUNAG; BUTTERFIELD, 1982). Os grupos SHRDC e SHRLA não apresentaram diferenças nas respostas bradicárdicas e taquicárdicas em relação ao grupo SHR, podemos justificar essas respostas devido à integridade dos barorreceptores arteriais aórticos nesses grupos (figura 30). Já o grupo SHRDSA apresentou uma resposta bradicárdica e taquicárdica menor em comparação a todos os grupos experimentais, confirmando achados prévios do nosso laboratório (MORAES-SILVA et

al., 2010; PIRATELLO et al., 2010; FLUES et al., 2012) e evidenciando a eficiência do procedimento de desnervação.

Além da disfunção barorreflexa presente na HA, também avaliamos a sensibilidade quimiorreflexa. Nos grupos com prejuízos dos quimiorreceptores (SHRDC, SHRLA e SHRDSA) observamos uma resposta reduzida conforme esperado, evidenciando a desnervação dos quimiorreceptores.

Também investigamos o comportamento autonômico através da variabilidade da FC e da PA no domínio do tempo e da frequência. Observamos alterações relevantes principalmente nos grupos SHRDA e SHRDSA, os quais apresentaram uma maior variabilidade da PA, assim como uma maior modulação autonômica simpática na pressão arterial sistólica. Esses achados confirmam que a disfunção barorreflexa obtida pela desnervação dos barorreceptores aórticos, modificam a modulação autonômica da FC e da PAS como observado em outros estudos (BUNAG; BUTTERFIELD, 1982; VAN VLIET; MONTANI, 1999). Acrescente-se o fato de que os animais SHR já apresentam alterações da modulação autonômica cardíaca e dos vasos (PA), conforme já discutido na primeira parte dessa discussão.

Outro resultado bastante relevante foi o da análise de gasometria arterial. Na desnervação sinoaórtica, sabe-se que existe uma redução da ventilação (IRIGOYEN et al., 1991; FRANCHINI; CESTARI; KRIEGER, 1994) o que nos animais normotensos, levou a uma redução da pO_2 e aumento da pCO_2 , tanto aguda como cronicamente. Além disso, a restauração do pO_2 nesses animais, elevou a PA para níveis hipertensivos na DSA aguda e crônica. Esses dados indicam que na normotensão, a hipoxemia induzida pela DSA está associada à eliminação dos quimiorreceptores carotídeos e as influências depressoras sobre a PA. De fato, em nosso estudo os grupos hipertensos com prejuízo dos quimiorreceptores (SHRDC, SHRLA e SHRDSA) apresentaram aumento somente

da $p\text{CO}_2$, não reproduzindo os mesmos resultados na PA e $p\text{O}_2$ observados em animais normotensos.

Em relação à função cardíaca avaliada através de medidas indiretas pelo ecocardiograma, identificamos maior fração de encurtamento e ejeção nos grupos SHRDA e SHRDSA. Esses resultados podem ser justificados pela liberação do simpático da sua inibição tônica exercida pelos barorreceptores e da já demonstrada hiperatividade simpática nesse modelo de hipertensão espontânea. (KRIEGER, 1970; FINK et al., 1981; MIAO et al., 2006). No entanto ao avaliarmos a função do VE pelo método invasivo, observamos que os animais submetidos à DSA apresentaram uma maior PDF, confirmando dados recentes do nosso grupo em ratos normotensos submetidos à DSA (FLUES et al., 2012, MOSTARDA et al., 2010; MOSTARDA et al 2011). Apesar dessas alterações cardíacas, a fração de colágeno e o diâmetro dos cardiomiócitos do VE não apresentaram diferenças entre os grupos de animais hipertensos. Podemos justificar essas divergências encontradas na literatura e até em trabalhos prévios de nosso grupo (FLUES, et al., 2012; MORAES-SILVA et al., 2010) frente a diferenças nas metodologias utilizadas em nosso protocolo. Essa pode ser uma limitação de nosso estudo, uma vez que na tentativa de minimizar a utilização de animais, os ratos utilizados para a realização do PCR não foram tratados com a técnica de parada cardíaca em diástole através da perfusão com cloreto de potássio, o que impediu a sua utilização para avaliações histológicas.

Dados recentes do nosso laboratório (não publicados) demonstraram em animais normotensos com DSA uma maior expressão gênica do ANF e da α -actina esquelética tanto no ventrículo direito como no VE, assim como em animais SHR. Entretanto, em nosso estudo houve apenas redução da expressão gênica da proteína contrátil α -MHC no grupo SHRDSA em comparação ao grupo SHR. Uma possível

explicação para o não aumento do ANF e da α -actina esquelética nos animais hipertensos dernervados, poderia ser o fato de que, pela própria hipertensão, esses marcadores já tivessem atingido um valor máximo, de tal forma a não responder mais a um novo estímulo.

Além das alterações crônicas do coração, mudanças periféricas também são observadas na HA. Algumas características vasculares são normalmente encontradas na HA, como: aumento do tonus arteriolar, essencialmente devido à hiperatividade simpática, remodelamento hipertrófico do músculo liso vascular ou aumento da relação espessura da parede / luz, e por fim rarefação vascular; essas alterações em conjunto podem ser associadas mecanisticamente ao aumento da RVP (SILVESTRE; LEVY, 2000).

Em nosso estudo, observamos que o grupo SHR apresentou rarefação capilar em relação aos animais normotensos, assim como já observado na literatura (LEWIS et al., 1994). No entanto, observamos que os grupos com diferentes tipos de desnervações apresentaram um aumento da capilarização no músculo sóleo em relação ao grupo SHR, sugerindo que em todos os grupos alguma alteração de perfusão pudesse justificar tal aumento.

Tem sido demonstrado que o músculo esquelético também pode ser afetado em indivíduos hipertensos, e que há uma grande correlação entre hipertensão e rarefação capilar (BEN BACHIR-LAMRINI et al., 1990; HENRICH et al., 1988; PREWITT; CHEN; DOWELL, 1982). Segundo esses autores, ocorre alterações no fenótipo muscular, seguido de uma transição das fibras de contração rápida para fibras de contração lenta, o que contribuiria para uma menor resistência à fadiga (CARLSEN; GRAY, 1987). Há controvérsias em relação a esses achados.

Gray (1988) evidenciou em SHR uma tendência à redução da área de secção transversa das fibras lentas e rápidas, mas não encontrou diferença na distribuição percentual das fibras nos cinco músculos estudados (sóleo, adutor magno, gastrocnêmio medial, bíceps femural e trapézio). Além disso, evidenciou uma tendência de discreto aumento na razão capilar/fibra em SHR, ao invés de diminuir.

Já Bortolotto e colaboradores (1999) investigaram as diferentes isoformas de cadeia pesada de miosina no músculo sóleo de SHR evidenciando um aumento da presença de fibras híbridas, o que por sua vez é visto como um marcador de transição fenotípica do músculo esquelético. Além disso, observaram que para um determinado tipo de fibra, não existem diferenças significativas entre SHR e Wistar-Kyoto.

Em relação aos nossos resultados, não houve diferenças dos grupos experimentais em relação ao grupo controle SHR. Apesar desses resultados negativos, esse estudo parece ser o primeiro a estudar a influência relativa dos barorreceptores e quimiorreceptores na hipertensão, avaliando seus efeitos sobre alterações estruturais musculares.

Em suma, apesar das evidências serem mais positivas em relação a transição de fenótipo do músculo esquelético na hipertensão, ainda permanecem dúvidas sobre a presença e a causa de tais alterações. Mesmo não tendo sido esse nosso objetivo primário nesse estudo, realizamos avaliações histoquímicas de miosina ATPase para confrontar nossos dados com a literatura em relação a alterações de tipagem muscular e capilarização.

7. CONCLUSÃO

Em SHR adultos foram observadas alterações hemodinâmicas e autonômicas condizentes com as previamente reportadas na literatura em humanos hipertensos, incluindo prejuízo no mecanismo reflexo de controle a curto prazo da PA, remodelamento cardíaco e alterações estruturais na musculatura esquelética. Adicionalmente, com intuito de propiciar o entendimento sobre alterações no padrão ventilatório na HA, nossos dados sugerem adaptações diafragmáticas que apontam para um aumento da demanda funcional com hipertrofia de fibras oxidativas e atrofia de fibras glicolíticas, paralelamente ao aumento da atividade do proteassoma e de hidroperoxidação lipídica.

Além disso, através das desnervações seletivas observamos que a ausência do controle reflexo exercido predominantemente pelos barorreceptores arteriais demonstrou uma maior influência do componente aórtico do que o carotídeo sobre a PA. Em adição, a função sistólica parece maior nos grupos SHRDA e SHRDSA, sugerindo que a desnervação aórtica, mesmo quando realizada em conjunto com a carotídea, esteja associada com ativação simpática. Não se observou alteração cardíaca na desnervação carotídea. Em relação ao músculo esquelético, todas as desnervações mostraram aumento de capilarização, enquanto somente o grupo SHRDSA mostrou redução de fibras intermediárias. O aumento de capilarização pode estar associado com a liberação do simpático periférico nas desnervações que incluem a retirada dos barorreceptores aórticos, levando ao aumento de VPA e à ausência dos quimiorreceptores nos grupos com desaferentação dos receptores carotídeos.

Finalmente, nossos resultados demonstraram a importância do barorreflexo no controle da PA a curto e a longo prazo na hipertensão, uma vez que as mudanças estruturais cardíacas e da musculatura esquelética estavam presentes nesses animais. Da mesma forma pelos procedimentos de desnervação carotídea e pelos testes de sensibilidade do quimiorreflexo em SHR, foi possível identificar alterações estruturais especialmente do diafragma nesse grupo, sugerindo que as desnervações seletivas puderam separar, pelo menos em parte, o papel desses contingentes de receptores nas respostas funcionais e estruturais à hipertensão.

7. REFERÊNCIAS

ABDALA, A. P. et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. **J Physiol**, v. 590, n. Pt 17, p. 4269-77, Sep 1 2012.

ADAMS, V.; DORING, C.; SCHULER, G. Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure. **Front Biosci**, v. 13, p. 302-11, 2008.

AMARAL, S. L. et al. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 19, n. 5, p. 931-40, May 2001.

ANDERSON, N. B. et al. Patterns of cardiovascular responses to stress as a function of race and parental hypertension in men. **Health Psychol**, v. 8, n. 5, p. 525-40, 1989.

BACURAU, A. V. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **J Appl Physiol**, v. 106, n. 5, p. 1631-40, May 2009

BARRES, C. et al. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. **Am J Physiol**, v. 263, n. 3 Pt 2, p. R639-46, Sep 1992.

BEN BACHIR-LAMRINI, L. et al. Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 258, n. 2 Pt 2, p. R352-7, Feb 1990.

BETTERS, J. L. et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 11, p. 1179-84, Dec 1 2004.

BING, O. H. et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 1, p. 383-96, Jan 1995.

_____. et al. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. **Heart Fail Rev**, v. 7, n. 1, p. 71-88, Jan 2002.

BISHOP, V. S. et al. Sinoaortic denervation in the nonhuman primate. **Am J Physiol**, v. 252, n. 2 Pt 2, p. R294-8, Feb 1987.

BOLUYT, M. O. et al. Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. **Circ Res**, v. 75, n. 1, p. 23-32, Jul 1994.

BORTOLOTTI, S. K.; STEPHENSON, D. G.; STEPHENSON, G. M. Fiber type populations and Ca^{2+} -activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 3 Pt 1, p. C628-37, Mar 1999.

BUNAG, R. D.; BUTTERFIELD, J. Tail-cuff blood pressure measurement without external preheating in awake rats. **Hypertension**, v. 4, n. 6, p. 898-903, Nov-Dec 1982.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; HAIBARA, A.S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 30-40, 2001.

CARLSEN, R. C.; GRAY, S. D. Decline of isometric force and fatigue resistance in skeletal muscles from spontaneously hypertensive rats. **Exp Neurol**, v. 95, n. 2, p. 249-64, Feb 1987.

CERONI, A. et al. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 94, n. 6, p. 630-40, Jun 2009.

CHIEN, K. R. Molecular advances in cardiovascular biology. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 916-7, May 14 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9, Apr 1987.

COWLEY, A. W., JR.; LIARD, J. F.; GUYTON, A. C. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. **Circ Res**, v. 32, n. 5, p. 564-76, May 1973.

CRUZ, J. C. et al. Peripheral chemoreceptors mediate training-induced plasticity in paraventricular nucleus pre-autonomic oxytocinergic neurons. **Exp Physiol**, v. 98, n. 2, p. 386-96, Feb 2013.

DE MAN, F. S. et al. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. **Circ Heart Fail**, v. 5, n. 1, p. 97-105, Jan 2012.

DEQUATTRO, V.; FENG, M. The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 16 Suppl 1, p. S64-9, Mar 2002.

DONALDSON, C. et al. Myosin cross-bridge dynamics in patients with hypertension and concentric left ventricular remodeling. **Circ Heart Fail**, v. 5, n. 6, p. 803-11, Nov 2012.

ESLER, M. et al. The sympathetic neurobiology of essential hypertension: disparate influences of obesity, stress, and noradrenaline transporter dysfunction? **Am J Hypertens**, v. 14, n. 6 Pt 2, p. 139S-146S, Jun 2001.

ESLER, M. The sympathetic system and hypertension. **Am J Hypertens**, v. 13, n. 6 Pt 2, p. 99S-105S, Jun 2000.

_____. Sympathetic nervous activation in essential hypertension: commonly neglected as a therapeutic target, usually ignored as a drug side effect. **Hypertension**, v. 55, n. 5, p. 1090-1, May 2010.

FARAH VDE, M. et al. Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 4, p. 477-82, Aug 2007.

FARD, A. et al. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 13, n. 6, p. 582-7, Jun 2000.

FELDMAN, A. M. et al. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. **Circ Res**, v. 73, n. 1, p. 184-92, Jul 1993.

FERRARIO, C. M.; MCCUBBIN, J. W.; PAGE, I. H. Hemodynamic characteristics of chronic experimental neurogenic hypertension in unanesthetized dogs. **Circ Res**, v. 24, n. 6, p. 911-22, Jun 1969.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N. Y.; OLIVEIRA, E. M. Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 9, p. 837-42, Sep 2010.

FERNANDES, T. et al. Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors: Role of MicroRNAs-16, -21, and -126. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 513-20, Feb 2012.

_____. et al. Effect of carotid and aortic baroreceptors on cardiopulmonary reflex: the role of autonomic function. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 7, p. 681-6, Jul 2010.

FINK, G. D. et al. Continuous blood pressure measurement in rats with aortic baroreceptor deafferentation. **Am J Physiol**, v. 241, n. 2, p. H268-72, Aug 1981.

FLORAS, J. S. et al. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. **J Hypertens**, v. 6, n. 7, p. 525-35, Jul 1988.

FLUES, K. et al. Cardiac and pulmonary arterial remodeling after sinoaortic denervation in normotensive rats. **Auton Neurosci**, v. 166, n. 1-2, p. 47-53, Jan 26 2012.

FRANCHINI, K. G. 2001. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 125-42, 2001.

FRANCHINI, K. G.; CESTARI, I. A.; KRIEGER, E. M. Restoration of arterial blood oxygen tension increases arterial pressure in sinoaortic-denervated rats. **Am J Physiol**, v. 266, n. 3 Pt 2, p. H1055-61, Mar 1994.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. **Am J Physiol**, v. 262, n. 4 Pt 2, p. R677-83, Apr 1992.

FRANCHINI, K.G.; KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. In: **Ganten D, de Jong W**, eds. **Handbook of Hypertension, Experimental and Genetic Models of Hypertension**. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1994; p. 482-500.

FRISK-HOLMBERG, M. et al. Muscle fibre composition in relation to blood pressure response to isometric exercise in normotensive and hypertensive subjects. **Acta Med Scand**, v. 213, n. 1, p. 21-6, 1983.

FROHLICH, E. D.; PFEFFER, M. A. Adrenergic mechanisms in human hypertension and in spontaneously hypertensive rats. **Clin Sci Mol Med Suppl**, v. 2, p. 225s-238s, Jun 1975.

FUKUI, K. et al. Captopril and hydralazine suppress atrial natriuretic peptide (ANP) gene expression in the ventricles of spontaneously hypertensive rat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 160, n. 1, p. 310-6, Apr 14 1989.

GRAY, S. D. Histochemical analysis of capillary and fiber-type distributions in skeletal muscles of spontaneously hypertensive rats. **Microvasc Res**, v. 36, n. 3, p. 228-38, Nov 2013.

GRASSI, G. et al. Heart rate, sympathetic cardiovascular influences, and the metabolic syndrome. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 1, p. 31-7, Jul-Aug 2009.

HAMALAINEN, N.; PETTE, D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 5, p. 733-43, May 1993.

HENRICH, H. A. et al. Capillary rarefaction characteristic of the skeletal muscle of hypertensive patients. **Klin Wochenschr**, v. 66, n. 2, p. 54-60, Jan 15 1988.

HERNANDEZ, N. et al. Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension. **Anat Rec**, v. 256, n. 4, p. 425-32, Dec 1 1999.

HERNELAHTI, M. et al. Muscle fiber-type distribution as a predictor of blood pressure: a 19-year follow-up study. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1019-23, May 2005.

HESS, V. et al. Interleukin-2-based biochemotherapy for patients with stage IV melanoma: long-term survivors outside a clinical trial setting. **Oncology**, v. 73, n. 1-2, p. 33-40, 2007.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 9, p. 1213-20, Sep 1998.

IRIGOYEN, M. C. et al. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1111-6, Dec 1995.

IRIGOYEN, M. C. et al. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. **Braz J Med Biol Res**, v. 24, n. 2, p. 219-22, 1991.

ITO, C. S.; SCHER, A. M. Regulation of arterial blood pressure by aortic baroreceptors in the unanesthetized dog. **Circ Res**, v. 42, n. 2, p. 230-6, Feb 1978.

JOSEPH, V. et al. Dexamethasone's influence on tyrosine hydroxylase activity in the chemoreflex pathway and on the hypoxic ventilatory response. **Pflugers Arch**, v. 435, n. 6, p. 834-9, May 1998.

JUDY, W. V.; FARRELL, S. K. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 1, n. 6, p. 605-14, Nov-Dec 1979. IS

JUHLIN-DANNFELT, A. et al. Central and peripheral circulation in relation to muscle-fibre composition in normo- and hyper-tensive man. **Clin Sci (Lond)**, v. 56, n. 4, p. 335-40, Apr 1979.

JUNG, T. et al. Age-related differences in oxidative protein-damage in young and senescent fibroblasts. **Arch Biochem Biophys**, v. 483, n. 1, p. 127-35, Mar 1 2009.

KLEIGER, R. E. et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 59, n. 4, p. 256-62, Feb 1 1987.

KRIEGER, E. M. Neurogenic Hypertension in the Rat. **Circ Res**, v. 15, p. 511-21, Dec 1964.

_____. 1984 . Neurogenic hypertension in the rat. In: JONG, W. DE (ed.). **Handbook of Hypertension Experimental and Genetic Models of Hypertension**. Elsevier Science Publishers B.B., p. 350 – 363.

_____. The acute phase of neurogenic hypertension in the rat. **Experientia**, v. 26, n. 6, p. 628-9, Jun 15 1970.

KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E. State-of-the-Art lecture: influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 720-3, Oct 1999.

KRIEGER, E. M.; MARSEILLAN, R. F. Aortic Depressor Fibers in the Rat: An Electrophysiological Study. **Am J Physiol**, v. 205, p. 771-4, Oct 1963.

KRIEGER, E. M.; SALGADO, H. C.; MICHELINI, L. C. Resetting of the baroreceptors. **Int Rev Physiol**, v. 26, p. 119-46, 1982.

KURTZ, T. W.; MORRIS, R. C., JR. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 10, n. 1, p. 127-31, Jul 1987

LA ROVERE, M. T. et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 478-84, Feb 14 1998.

LA ROVERE, M. T. et al. Prognostic implications of baroreflex sensitivity in heart failure patients in the beta-blocking era. **J Am Coll Cardiol**, v. 53, n. 2, p. 193-9, Jan 13 2009.

LEWIS, D. M. et al. A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition. **Exp Physiol**, v. 79, n. 3, p. 377-86, May 1994.

LINDSAY, D. C. et al. Histological abnormalities of muscle from limb, thorax and diaphragm in chronic heart failure. **Eur Heart J**, v. 17, n. 8, p. 1239-50, Aug 1996.

LUNDIN, S.; RICKSTEN, S. E.; THOREN, P. Interaction between "mental stress" and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiol Scand**, v. 120, n. 2, p. 273-81, Feb 1984.

MALPAS, S. C. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. **Physiol Rev**, v. 90, n. 2, p. 513-57, Apr 2010.

MANCIA, G. et al. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. **Circ Res**, v. 53, n. 1, p. 96-104, Jul 1983.

MATSUBARA, H. et al. Changes of atrial natriuretic peptide and its messenger RNA with development and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. **Circ Res**, v. 66, n. 1, p. 176-84, Jan 1990.

MIAO, C. Y. et al. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. **J Hypertens**, v. 24, n. 6, p. 1125-35, Jun 2006.

MICHELINI, L. C. Oxytocin in the NTS. A new modulator of cardiovascular control during exercise. **Ann N Y Acad Sci**, v. 940, p. 206-20, Jun 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Política Nacional de Humanização da Atenção e Gestão do SUS. Linha de Cuidado – Hipertensão Arterial Sistêmica. São Paulo. **Ministério da Saúde**, 2010.

MORAES-SILVA, I. C. et al. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, n. 3, p. e114-20, Mar 2010.

MORRISON, S. F.; WHITEHORN, D. Baroreceptor reflex gain is not diminished in spontaneous hypertension. **Am J Physiol**, v. 243, n. 5, p. R500-5, Nov 1982.

MOSTARDA, C. et al. Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. **J Card Fail**, v. 17, n. 6, p. 519-25, Jun 2011.

MOSTARDA, C. et al. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, n. 4, p. 447-52, Apr 2010.

NOBRE, F.; RIBEIRO, A. B.; MION, D., JR. [Control of arterial pressure in patients undergoing anti-hypertensive treatment in Brazil: Controlar Brazil]. **Arq Bras Cardiol**, v. 94, n. 5, p. 663-70, May 2010.

NOGUEIRA, D. et al. [Awareness, treatment, and control of arterial hypertension: Pro-Saude study, Brazil]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, n. 2, p. 103-9, Feb 2010.

NORMAN, R. A., JR.; COLEMAN, T. G.; DENT, A. C. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. **Hypertension**, v. 3, n. 1, p. 119-25, Jan-Feb 1981.

NOVAK, V. et al. Altered cardiorespiratory transfer in hypertension. **Hypertension**, v. 23, n. 1, p. 104-13, Jan 1994.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-93, Mar 1963.

OKAMOTO, K. et al. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 30, n. 6, p. 703-16, Jun 1966.

OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: aspectos moleculares. **Hipert**, v. 5, n. 2, p. 73-78, 2002.

ORLOWSKI, A. et al. Reduced sarcolemmal expression and function of the NBCe1 isoform of the Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in hypertrophied cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. **Cardiovasc Res**, Nov 18 2013.

PAGANI, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ Res**, v. 59, n. 2, p. 178-93, Aug 1986.

PARATI, G.; STAESSEN, J. A. Day-night blood pressure variations: mechanisms, reproducibility and clinical relevance. **J Hypertens**, v. 25, n. 12, p. 2377-80, Dec 2007.

PARATI, G.; VALENTINI, M. Prognostic relevance of blood pressure variability. **Hypertension**, v. 47, n. 2, p. 137-8, Feb 2006.

PIRATELLO, A. C. et al. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1345-50, 2010.

POWERS, G. L. et al. Proteasome inhibition represses ERalpha gene expression in ER+ cells: a new link between proteasome activity and estrogen signaling in breast cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 10, p. 1509-18, Mar 11 2010.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; LEVINE, S. Prolonged mechanical ventilation alters diaphragmatic structure and function. **Crit Care Med**, v. 37, n. 10 Suppl, p. S347-53, Oct 2009.

PRABHAKAR, N. R.; PENG, Y. J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 1, p. 359-66, Jan 2004.

PREWITT, R. L.; CHEN, II; DOWELL, R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol**, v. 243, n. 2, p. H243-51, Aug 1982.

QUADRILATERO, J.; RUSH, J. W. Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 4, p. 1149-61, Oct 2006.

RIZZONI, D. et al. Antidiuretic hormone and atrial natriuretic peptide during lower body negative or positive pressure in hypertensive patients with and without left ventricular hypertrophy. **Clin Exp Hypertens A**, v. 14, n. 4, p. 717-32, 1992.

ROSENZWEIG, A.; SEIDMAN, C. E. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. **Annu Rev Biochem**, v. 60, p. 229-55, 1991.

SABBATINI, M.; VEGA, J. A.; AMENTA, F. Peripheral nerve vascular changes in spontaneously hypertensive rats. **Neurosci Lett**, v. 217, n. 2-3, p. 85-8, Oct 18 1996.

SADOSHIMA, J. et al. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. **J Biol Chem**, v. 267, n. 15, p. 10551-60, May 25 1992.

SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072-83, Dec 1978.

SALGADO, H. C. et al. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 1, p. H593-600, Jan 2007.

SANDERS, M. H. Article reviewed: Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. **Sleep Med**, v. 1, n. 4, p. 327-328, Oct 1 2000.

SCHWARTZ, K. et al. Regulation of myosin heavy chain and actin isogenes during cardiac growth and hypertrophy. **Symp Soc Exp Biol**, v. 46, p. 265-72, 1992.

SEALS, D. R. et al. Exercise and aging: autonomic control of the circulation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 26, n. 5, p. 568-76, May 1994.

SHARMA, A. et al. Involvement of catecholamines and serotonin in human hypertension. **Pharmacol Res Commun**, v. 17, n. 6, p. 565-74, Jun 1985.

SILVESTRE, J. S.; LEVY, B. I. [Hypertension: microvascular complications]. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 93, n. 11 Suppl, p. 1387-92, Nov 2000.

SMITH, P. A. et al. Relationship between central sympathetic activity and stages of human hypertension. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 3, p. 217-22, Mar 2004

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**, v. 48, n. 3, p. 309-19, Mar 1981.

VAN VLIET, B. N.; MONTANI, J. P. Baroreflex stabilization of the double product. **Am J Physiol**, v. 277, n. 5 Pt 2, p. H1679-89, Nov 1999.

VIKSTROM, K. L. et al. Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis. **Circ Res**, v. 82, n. 7, p. 773-8, Apr 20 1998.

[VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 1 Suppl, p. 1-51, Jul 2010.

ZERGEROGLU, M. A. et al. Mechanical ventilation-induced oxidative stress in the diaphragm. **J Appl Physiol** (1985), v. 95, n. 3, p. 1116-24, Sep 2003.

ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 3, p. 229-36, Jun 2011.