

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

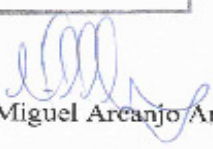


BRÍGIDA FIGUEIREDO DE BARROS

**“ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES DE FÊMEAS DE
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)
RELACIONADAS COM A IDADE”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Brígida Figueiredo de Barros
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.


Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B278a

Barros, Brígida Figueiredo de
Alterações cardiovasculares de ratas espontaneamente
hipertensas (SHR) relacionadas com a idade / Brígida
Figueiredo de Barros. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Miguel Arcanjo Areas.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual do
Campinas, Instituto de Biologia

1. Ratos espontaneamente hipertensos. 2.
Eletrocardiograma. 3. Idade. 4. Pressão arterial. 5.
Hipertrofia. I. Areas, Miguel Arcanjo, 1952-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Título em inglês: Cardiovascular changes in female spontaneously hypertensive rats (SHR) age-related.

Palavras-chave em inglês: Spontaneously hypertensive rats; Electrocardiogram; Blood pressure; Aging; Hypertrophy.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Miguel Arcanjo Areas, Dora Maria Grassi Kassisse, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Carlos Alberto Silva, Maria José Costa Sampaio Moura.

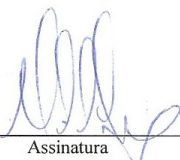
Data da defesa: 23/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

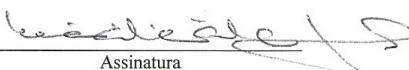
Campinas, 23 de Fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis


Assinatura

Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva


Assinatura

Profa. Dra. Estela Maria Gonçalves

Assinatura

Prof. Dr. Félix Guillermo Reyes Reyes

Assinatura

Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Assinatura

Muitos se perguntam: que mundo nós deixaremos para nossos filhos? Porém,
a pergunta correta é: que filhos nós estamos deixando para o nosso
mundo?"

Brígida F. de Barros

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu companheiro de todas as horas, meu grande incentivador, meu porto seguro. Espírito afim, compreensivo e dedicado, meu amor: Júnior. E aos meus filhos, anjos em nossas vidas: Leonardo e Cecília.

Agradecimento Especial

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Miguel. Exemplo de educador,
humano, sensível: muito além do título, um mestre na arte de ensinar.

Agradecimientos

Gostaria de agradecer a Deus pela vida e pela força diante das dificuldades encontradas ao longo desta trajetória, que desde o início se apresentou com contratempos, mas ao mesmo tempo cercada de espíritos bons e companheiros.

A Professora Dra. Maria Cristina pela calorosa recepção, permitindo que eu participasse das aulas como PED e pelos conselhos e sugestões muito pertinentes na correção deste trabalho.

A Professora Dra. Dora por permitir o uso de seu laboratório, pela convivência amigável e agradável, além é claro de colaborar de forma excelente tanto na qualificação quanto na correção deste trabalho.

Ao Professor Dr. Felix pelo auxílio na aquisição dos equipamentos de última geração do laboratório, o que permitiu um avanço considerável no diagnóstico e estudo dos modelos experimentais.

Aos amigos de laboratório, Fernanda e Luis, aos quais agradeço a oportunidade de compartilhar conhecimentos durante os estudos e experimentos e pela constante presteza, o que permitiu a produção de resultados interessantes.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação: Profa. Helena, Profa. Carmem e Prof Boschero pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Aos colegas de pós-graduação: Emiliane, Tatiana, Gabriela, Chico, Clodoaldo e novatos, pela alegre convivência e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da secretária de pós-graduação, Andréia e Silvia Regina pelo extremo profissionalismo, competência e simpatia a mim dispensada, meus agradecimentos.

As funcionárias da Biblioteca, pela orientação prestada e confecção da ficha catalográfica.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica, e funcionários da aula prática, Marcelo e Priscila, e biotério, Lécio e Washington, pelo apoio e cuidado de meus animais durante esses 4 anos.

A Capes, pelo apoio financeiro.

A minha sogra, D. Neida e ao meu sogro, Sr. Toninho, pelo auxílio desde o início da pós-graduação, cuidando primeiramente do Léo e agora também da Cecília para que eu pudesse ter a tranquilidade de fazer os experimentos e dar minhas aulas.

A minha mãe, Fernanda, a minha avó, Maria e aos meus irmãos, Gabi e Vic, pela paciência que tiveram com meus anjinhos quando precisavam de cuidados.

A toda minha família, cunhados, compadres, primos e tios pela paciência que tiveram e entendimento quanto à falta de tempo disponível por ter que me dividir entre aulas e experimentos. E aos amigos, Ione e Tieme, Marcelina e Marcelo, Cinthia, Karina, Silvia pelo incentivo ao longo desta trajetória e pelas palavras de otimismo.

Obrigada a todos.

ÍNDICE

1. Resumo -----	3
2. Summary -----	6
3. Lista de abreviaturas -----	9
4. Introdução Geral -----	11
5. Objetivos -----	13
6. Capítulo I – “Hipertensão Arterial e Função Cardiovascular”-----	15
6.1. Hipertensão primária -----	17
6.2. Hipertensão secundária -----	18
6.3. Função cardíaca -----	19
6.4. Ciclo Cardíaco -----	19
6.5. Função Cardíaca e envelhecimento -----	22
6.6. Hipertrofia Cardíaca -----	25
6.7. Rato espontaneamente hipertenso -----	26
7. Capítulo II – “Age-Related changes in blood pressure, ventricular parameters and electrical cardiac activity in female spontaneously hypertensive rats.” -----	30
Abstract -----	32
Introduction -----	33
Material and Methods -----	34
Statistics -----	36
Results -----	36
Discussion -----	38
References -----	42
Tables -----	45

Legends -----	47
Figures -----	48
8. Capítulo III - “Hipertensão arterial altera a variabilidade da frequência cardíaca em fêmeas adultas SHR no período pré-menopausa.” -----	53
8.1. Introdução -----	55
8.1.1. Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e Sistema Nervoso Autônomo -----	55
8.1.2. Determinação da VFC através do registro Eletrocardiográfico -	57
8.1.3. Índices de VFC -----	57
8.1.4. VFC e Controle Metabólico -----	61
8.2. Objetivos-----	63
8.3. Material e Métodos -----	64
8.4. Resultados e Discussão -----	67
8.5. Conclusão -----	74
8.6. Referências Bibliográficas -----	75
9. Conclusões Gerais da Tese -----	80
10. Referências Bibliográficas Gerais -----	82
11. Anexos -----	98
11.1. Parecer do Comitê de Ética -----	99
11.2. Comprovante de submissão do trabalho para publicação -----	101
11.3. Estudo de Caso -----	102

1. Resumo

A hipertensão arterial (HA) é um dos principais distúrbios cardiovasculares, podendo desencadear alterações na vasculatura sistêmica. Modelos experimentais são amplamente utilizados em estudos sobre as alterações que ocorrem no sistema cardiovascular induzidas pela HA. O rato SHR é o modelo que mais se aproxima da HA essencial humana, pois apresenta características similares, como aumento da resistência periférica total, do débito cardíaco e da hipertrofia ventricular esquerda. Assim, ratas SHR podem constituir em modelo de hipertensão na menopausa, muito semelhante ao encontrado em mulheres. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a partir de qual momento do período reprodutivo são observadas alterações significativas na função cardiovascular de ratas SHR. Foram estudadas ratas SHR com idade a partir de 3 meses até 12 meses. O eletrocardiograma (ECG) foi realizado nas ratas sob anestesia ao final de cada mês de idade para se determinar o período no qual foram observadas as alterações na excitação e condução elétrica cardíaca que, tornaram-se significativamente diferentes. A partir desses resultados, esses animais foram distribuídos em 3 grupos (n=10 cada) de estudo: 3, 6 e 12 meses de idade. Foi observado, através do método do esfregaço vaginal, que as ratas dos grupos de 3 e 6 meses estavam ciclando enquanto que as ratas de 12 meses já haviam parado de ciclar. Foram determinadas a pressão arterial (PA) sistêmica e parâmetros hemodinâmicos ventriculares por meio da cateterização da artéria femoral em ratas anestesiadas. Com esses resultados pudemos avaliar a função sistólica (+dp/dt), a força de contração (IC), a função diastólica (-dp/dt) e a complacência (tau) do ventrículo esquerdo. A hipertrofia foi verificada através da morfometria do ventrículo esquerdo. Além disso, avaliou-se a atividade do SNA sobre a função cardíaca através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC). As ratas SHR apresentaram desde os três meses, elevação gradual e progressiva da PA, de acordo com o envelhecimento dos

animais, quando comparadas com ratas Wistar das mesmas idades. Tais efeitos da progressão da idade, também foram observados no estudo eletrocardiográfico, o qual apresentou a partir dos seis meses, alterações significativas nas durações dos intervalos QRS, QT e QTc e alterações na morfologia do traçado do ECG, com superposição de duas ondas R e inversão da onda T, característico de isquemia cardíaca, resultados inéditos para este modelo. Nos parâmetros hemodinâmicos ventriculares, observou-se aumento da força de contração devido à hipertrofia ventricular a partir dos seis meses de idade. Com o passar do tempo (12 meses), essa hipertrofia tornou-se prejudicial, pois, foi acompanhada de redução da complacência ventricular, prejudicando assim, a atividade lusitrópica. Além disso, os dados da VFC indicaram que, a partir dos seis meses de idade, há predominância do tônus simpático sobre a função cardíaca, associada à redução da modulação parassimpática. Em conclusão, ratas SHR apresentaram a partir dos 6 meses de idade, alterações cardiovasculares significativas que resultaram em retardo na transmissão do impulso elétrico cardíaco, aumento da sobrecarga do ventrículo esquerdo, podendo resultar em arritmias cardíacas e morte súbita, como foi precocemente observado pela análise da VFC.

2. Summary

Hypertension is a major cause of cardiovascular disorders, and the natural progression of this disease may trigger further changes in the circulatory system. Experimental models are widely used in studies on the changes that occur in the cardiovascular system induced by hypertension. The SHR is the model that most closely matches the human hypertension, as it has similar characteristics, such as increased peripheral resistance, cardiac output and progressive left ventricular hypertrophy. Thus, female SHR may become a model of hypertension in menopause, very similar to that found in women. The aim of this study was to assess from which time of pre-menopausal period are significant changes in cardiovascular function of female SHR, independent of the absence of estrogenic activity. Cardiac electrical activity was assessed by electrocardiogram (ECG) performed in rats under anesthesia at the end of each month of age to determine the period in which we would observe the changes in excitation and cardiac electrical conduction become significantly different. From these results, these animals were distributed into 3 groups (n=10) of study: 3, 6 and 12 month-old. It was also observed that female with 3 and 6 month old were cycling through the vaginal smear method. We determined the blood pressure and hemodynamic ventricular through catheterization of right femoral artery in anesthetized rats. With these results, we evaluated the systolic function ($+dp/dt$), contractility index (IC), diastolic function ($-dp/dt$) and complacency (τ) of left ventricle. Cardiac remodeling or hypertrophy was assessed by left ventricular morphometry. In addition, we assessed the Autonomic Nervous System activity on cardiac function through the heart rate variability analysis as an indicator of cardiovascular involvement. The young SHR (3 month old) showed a gradual and progressive increase since the beginning of the blood pressure according to the aging, when compared to Wistar rats of the same age. Such ageing effects were also observed in

ECG study of SHR, which showed from 6 month-old, significant changes in the QRS, QT and QT interval durations and changes in the ECG morphology, with superposition of two R waves and T wave inversion, typical of cardiac ischemia, which are new results for this model. For ventricular hemodynamic parameters, there was an increased contractility index due to left ventricular hypertrophy from 6 month. Over time (12 month), this hypertrophy has become harmful because it was associated with reduce ventricular compliance, thereby damaging the lusitropic activity. Furthermore, data from heart rate variability indicated that, since 6 month-old tone sympathetic tone predominance on heart function associated with reduction of parasympathetic modulation, making these animals subjected to arrhythmias. In conclusion, SHR showed from 6 month-old, significant cardiovascular changes that result in delay in transmission of cardiac electrical impulse, increased left ventricular overload and may result in cardiac arrhythmias and sudden death, as prematurely observed by the of heart rate variability.

3. Lista de Abreviaturas

AV: Átrio Ventricular
BP: Blood Pressure
dP/dt máxima: pressão intraventricular máxima
dP/dt mínima: pressão intraventricular mínima
ECG: Eletrocardiograma
EDP: End Diastolic Pressure
FC: Frequência Cardíaca
GMPc: Guanosina Monofosfato Cíclico
HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL: lipoproteína de alta densidade
HR: Heart Rate
IC: Índice de Contração
IRP: Período de Relaxamento Isovolumétrico
LDL: lipoproteína de baixa densidade
NaCl: Cloreto de Sódio
NO: Monóxido de Nitrogênio
NOS: Óxido Nítrico Sintase
PA: Pressão Arterial
PAM: Pressão Arterial Média
PDF: Pressão Diastólica Final
PS: Pressão Sistólica
SHR: Spontaneously Hypertensive Rat
SRA: Sistema Renina Angiotensina
VDF: Volume Diastólico Final
VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

4. Introdução Geral

A hipertensão é um dos mais importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares, tanto em homens quanto mulheres. Pacientes com elevada pressão arterial, frequentemente, apresentam estrutura e/ou função cardíaca anormal, incluindo hipertrofia ventricular esquerda, disfunção sistólica e diastólica e, em casos extremos, aumento do risco de arritmias e morte súbita (Lip et al., 2000).

A maior incidência de hipertensão em homens que em mulheres de mesma idade, sugere a participação do dimorfismo sexual mediado pelo estrógeno que tem efeito protetor no sistema cardiovascular (Farhat et al., 1996; Reckelhoff et al., 2000; Thompson & Khalil, 2003). Assim, a incidência de hipertensão também é maior em mulheres no período pós-menopausa quando comparadas no período pré-menopausa (Tolbert & Oparil, 2001; Fortepiani et al., 2003; August & Oparil, 1999).

Desta forma, diversos estudos foram realizados para demonstrar que a Terapia de Reposição Hormonal poderia apresentar benefícios vasculares em menopausa (Rosano et al., 1993; Gerhard & Ganz, 1995; Grodstein et al., 1996). Porém, pesquisadores demonstraram que a Reposição Hormonal pode não ter efeito benéfico sobre a pressão arterial de mulheres idosas hipertensas (Simon et al., 2001; Enstrom et al., 2002; Grimes & Lobo 2002; Mills et al., 2003).

De fato, o processo do envelhecimento, *per se*, já acarreta uma série de alterações no organismo. Harmam (2001) define o envelhecimento como o acúmulo progressivo de diversas alterações deletérias nas células e tecidos, que aumentam o risco do desenvolvimento de doenças e morte. Desta forma, o processo do envelhecimento e suas características constituem em fenômeno biológico pouco estudado devido a sua complexidade e a dificuldade em dissociar os efeitos normais da idade daqueles que são consequência das doenças relacionadas com o envelhecimento.

5. Objetivos

Gerais: O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a partir de qual momento do período pré-menopausa são observadas alterações significativas na função cardiovascular de ratas SHR, relacionadas com a idade.

Específicos: Considerando a fase reprodutiva (período entre três e doze meses de idade), este trabalho teve por objetivos específicos estudar em ratas SHR com três, seis e doze meses de idade, os seguintes parâmetros cardiovasculares:

- 1) Excitação e condução elétrica cardíaca, através da análise eletrocardiográfica.
- 2) Pressão arterial sistólica, diastólica e média, assim como duração do ciclo cardíaco e frequência cardíaca.
- 3) Parâmetros hemodinâmicos do ventrículo esquerdo: pressão dicrótica (fechamento da valva aórtica), atividade inotrópica (dP/dt máxima), relaxamento ventricular (dP/dt mínima), índice de contratilidade (IC), pressão diastólica final, atividade lusitrópica ou constante de relaxamento (τ)
- 4) Determinação da área dos cardiomiócitos através da análise morfométrica do ventrículo esquerdo.
- 5) Avaliação da atividade do Sistema Nervoso Autônomo sobre a função cardíaca, através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca, como um indicador sensível e antecipado de comprometimento cardiovascular.

6. Capítulo I

Hipertensão Arterial e Função Cardiovascular

Trabalho será encaminhado sob a forma de artigo de revisão para a Revista Brasileira de Hipertensão.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das principais causas de complicações cardiovasculares em nosso meio, devido a sua alta incidência e pelo fato de ser uma doença silenciosa (Nawrot & Staessen, 2003). Frequentemente, o seu diagnóstico é efetuado quando há complicações ou comprometimento de órgãos alvos como o coração, cérebro e rins (Nawrot et al., 2003; Hyman et al., 2003; Gross & Amann, 2004).

Hipertensão é definida como a elevação anormal da pressão diastólica e/ou pressão sistólica e/ou da pressão arterial média. Cabe ressaltar que nos últimos anos, o valor da diastólica tem sido enfatizado na avaliação da hipertensão (Smulyan & Safar, 2000).

Em 90-95% dos casos de pacientes com hipertensão, a causa é desconhecida, sendo denominada de hipertensão arterial primária (essencial). Os restantes 5-10% dos pacientes hipertensos apresentam hipertensão que resulta, secundariamente, de uma disfunção renal, endócrina ou outras causas identificáveis, sendo então chamada de hipertensão secundária (Mullins et al., 2006).

6.1. Hipertensão primária

Apesar de muitos anos de pesquisa, não há ainda uma hipótese única para explicar a patogênese da hipertensão primária. A progressão natural da doença sugere que a elevação precoce do volume sanguíneo e do débito cardíaco poderia desencadear alterações posteriores na vasculatura sistêmica, promovendo uma maior resistência. Pesquisadores têm sugerido que os rins de muitos pacientes hipertensos apresentam incapacidade para lidar adequadamente com o íon sódio (Orlov & Mongin, 2007), aumentando sua retenção, o que poderia explicar o aumento do volume de sangue.

Na hipertensão crônica, o volume sanguíneo e o débito cardíaco são frequentemente normais, pois a hipertensão é sustentada por elevação na resistência vascular sistêmica em

vez de aumento do débito cardíaco. Esse aumento da resistência é causado por espessamento das paredes dos vasos arteriais aumentando, assim, a resistência devido à redução no diâmetro do lúmen vascular. Há também evidências de aumento do tônus vascular, mediado por atividade simpática (Julius & Nesbitt, 1996) ou pelo aumento das concentrações circulantes de angiotensina II (De Wardener & MacGregor, 2002).

Consideráveis evidências têm sugerido que mudanças na função endotelial vascular pode causar o aumento do tônus vascular. Por exemplo, em pacientes hipertensos, o endotélio vascular produz menos óxido nítrico (NO) e o músculo liso vascular desses pacientes é menos sensível à ação deste potente vasodilatador (Taddei et al., 1993; Rees et al., 1996; McIntyre et al., 1997; Payne et al., 2004). Ocorre, também, aumento na produção de endotelina, que é um potente vasoconstritor (Levin, 1995).

6.2. Hipertensão secundária

Enquanto a hipertensão primária não tem uma causa conhecida, sendo assim chamada de idiopática, a secundária é resultante de alguma doença já instalada como, por exemplo, estenose aórtica (Hein et al., 2003, Bauml & Underwood, 2010), doença renal crônica, hiperaldosteronismo, estresse emocional com ativação do Sistema Nervoso Simpático (Malpas, 2010), apnéia do sono (Dempsey et al., 2010) e pré-eclampsia (Sibai et al., 2005). Independentemente da causa, a pressão arterial torna-se elevada, quer devido ao aumento do débito cardíaco, aumento da resistência vascular sistêmica, ou ambos.

Quando o débito cardíaco é elevado, observa-se geralmente a ativação de mecanismos neuro-humorais como, por exemplo, a ação do sistema nervoso simpático sobre o coração provocando taquicardia e vasoconstrição. Além disso, o aumento do volume sangüíneo pode provocar aumento da pressão venosa central ocasionando

aumento da pressão no átrio direito, no ventrículo direito e na fase final da diástole. Esse aumento da pré-carga ventricular, aumenta o volume de ejeção ventricular pelo mecanismo de Frank-Starling (Lorell & Carabello, 2000). O aumento no volume de sangue que sai do ventrículo direito, aumenta o fluxo sanguíneo das veias pulmonares para o ventrículo esquerdo, aumentando assim a pré-carga ventricular esquerda e o volume de ejeção. Aumento no volume de ejeção, então, aumenta o débito cardíaco e ,consequentemente, a pressão arterial.

6.3. Função Cardíaca

A principal função do coração é impulsionar o sangue para todos os tecidos através dos vasos sanguíneos, gerando e mantendo a pressão arterial de perfusão adequada aos órgãos, através da contração das paredes musculares do coração em torno de uma câmara fechada, gerando pressão suficiente para conduzir o sangue através da valva aórtica, por exemplo, em direção à artéria aorta (Guyton & Hall, 2010).

6.4. Ciclo Cardíaco

O ciclo cardíaco é a seqüência dos eventos que ocorrem entre o enchimento atrial e a sístole ventricular. Um único ciclo de atividade cardíaca pode ser dividido em duas fases. A primeira fase é a diástole, que representa o enchimento ventricular, momento no qual os ventrículos estão relaxados. A segunda etapa é a sístole, representada pelo tempo de contração e pela ejeção do sangue dos ventrículos. Para analisar estas duas etapas em mais detalhes, o ciclo cardíaco é geralmente dividido em cinco fases que estão bem definidas e já são encontradas em detalhes em livros texto (Guyton & Hall, 2010) e em sites acadêmicos (<http://www.cvphysiology.com>):

i) Enchimento passivo

A maior parte do enchimento ventricular ocorre nessa etapa, quando todas as partes do miocárdio estão relaxadas. Durante essa fase, a pressão do sangue nos átrios é ligeiramente superior à dos ventrículos, a válvula átrio-ventricular (AV) permanece aberta e o sangue flui das veias cavas e pulmonares para os átrios direito e esquerdo, respectivamente, e daí para os ventrículos.

ii) Contração atrial

Esta fase do ciclo cardíaco, é iniciada pela despolarização elétrica dos átrios que corresponde a onda P do eletrocardiograma (ECG). A despolarização atrial, em seguida, causa a contração da musculatura atrial. Com a contração dos átrios, a pressão dentro da câmara atrial aumenta, direcionando o fluxo sanguíneo para os ventrículos. Como consequência abrem-se as válvulas atrioventriculares (AV) permitindo rápido fluxo de sangue para os ventrículos. O sangue não flui de volta para a veia cava por causa dos efeitos inerciais do retorno venoso e por causa da onda de contração que se move através do átrio de cima para baixo.

A contração atrial responde, normalmente, por cerca de 10% do enchimento ventricular esquerdo para uma pessoa em repouso, o restante do enchimento ventricular ocorre quando o sangue flui passivamente das veias pulmonares para o átrio esquerdo, depois da abertura da válvula mitral. Com o aumento da frequência cardíaca, entretanto, a contração atrial pode representar até 40% do enchimento ventricular.

Após a contração atrial, a pressão atrial começa a cair, provocando inversão do gradiente de pressão através das válvulas AV. Neste momento, o volume ventricular é máximo e denominado de volume diastólico final (VDF) e representa a pré-carga ventricular.

iii) Contração ventricular isovolumétrica

Esta fase do ciclo cardíaco é gerada pela despolarização ventricular e representada pelo complexo QRS do ECG. Esse fenômeno representa o acoplamento excitação-contracção, a contracção do miócito e rápido aumento da pressão intraventricular, conhecida como dP/dt máxima ou positiva.

As válvulas AV se fecham porque a pressão intraventricular ultrapassa a pressão atrial. Durante o período de tempo entre o fechamento das válvulas AV e a abertura das válvulas aórtica e pulmonar, a pressão ventricular aumenta rapidamente, sem alteração do volume do ventrículo esquerdo, ocorrendo, assim, a contracção isovolumétrica. A taxa de aumento da pressão nos ventrículos é determinada pela taxa de contracção das fibras musculares (índice de contratilidade) e é determinada por mecanismos que regem o acoplamento excitação-contracção.

iv) Ejeção

Esta fase representa a ejeção rápida do sangue para as artérias pulmonar e aorta dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente. A ejeção começa quando a pressão intraventricular excede a pressão dentro das artérias aorta e pulmonar, o que faz com que as valvas aórtica e pulmonar se abram. O sangue é ejetado, porque a energia total do sangue dentro do ventrículo excede a energia total do sangue dentro da aorta. Em outras palavras, há um gradiente de energia para impulsionar o sangue para as artérias aorta e pulmonar em seus respectivos ventrículos. Durante esta fase, a pressão ventricular normalmente excede a pressão da via de saída em poucos mmHg. A velocidade de escoamento é máxima no início da fase de ejeção as pressões das artérias aorta e pulmonar também são máximas (sistólica).

Cerca de 200 milissegundos depois do início do complexo QRS e o início da contração ventricular, ocorre a repolarização ventricular representada pela onda T do ECG. A repolarização leva a diminuição da tensão ventricular e, portanto, a taxa de ejeção (esvaziamento do ventrículo esquerdo) cai. A pressão ventricular cai ligeiramente abaixo da pressão da via de saída (dp/dt mínima ou negativa), no entanto, o fluxo de saída ainda ocorre devido à energia (ou inércia) cinética do sangue.

v) Relaxamento isovolumétrico

Quando as pressões intraventriculares caem ao final da fase iv, as valvas aórtica e pulmonar fecham abruptamente dando início ao relaxamento isovolumétrico. O fechamento da valva está associado a pequeno refluxo de sangue para os ventrículos e entalhe característico (nó dicrótico) nos traçados de pressão da aorta e da artéria pulmonar. A taxa de declínio da pressão nos ventrículos é determinada pela taxa de relaxamento das fibras musculares (τ), sendo esse fenômeno denominado lusitropismo.

Os ventrículos continuam relaxados e a pressão intraventricular se torna menor que a pressão atrial. A partir deste momento, as válvulas AV abrem-se rapidamente e começa o enchimento ventricular. Apesar do afluxo de sangue dos átrios, a pressão intraventricular continua a cair rapidamente, porque os ventrículos estão ainda em fase de relaxamento. Uma vez relaxados, a pressão dos ventrículos começa a subir lentamente, à medida que o sangue enche os átrios.

6.5. Função Cardíaca e Envelhecimento

O envelhecimento tem sido definido como a perda progressiva das capacidades fisiológicas, em diferentes níveis, que culminam em morte (Dice, 1993). O conhecimento sobre os mecanismos causadores do envelhecimento é, contudo, ainda muito limitado e

geralmente menos substancial que o conhecimento sobre os processos de regulação do crescimento e melhoria funcional (Folkow & Svanborg, 1993).

Em um contexto fisiológico, existem três principais circunstâncias que afetam a capacidade de identificar claramente as mudanças puramente relacionadas à idade (Folkow Svanborg, 1993).

- i) Alguns órgãos e sistemas orgânicos têm uma maior capacidade de reserva do que outros, ou grande capacidade de se regenerarem após dano. Por exemplo, o fígado.
- ii) Em humanos, é particularmente difícil diferenciar as manifestações do envelhecimento *per se* dos sintomas de morbidade, especialmente em idades mais avançadas, quando a morbidade é mais comum.
- iii) Além disso, o estudo com seres humanos mostrou que as alterações cardiovasculares relacionadas com o envelhecimento não ocorrem só entre as diferentes populações, mas sim, entre faixas etárias diferentes numa mesma população.

Evidentemente, o estilo de vida e o meio ambiente podem influenciar a taxa, a extensão e as conseqüências de processos funcionais que são atualmente relacionados ao envelhecimento natural.

Muitos autores têm observado que, durante o envelhecimento, a capacidade do endotélio em liberar NO é reduzida (Matz et al., 2000; Hamilton et al., 2001; Vanhoutte, 2002) . No entanto, deve-se levar em consideração de que o envelhecimento das células endoteliais leva a maior liberação de sequestradores de NO (Muscari et al., 1996; Hamilton et al., 2001). *In vivo*, a resposta a vasodilatadores ou a depressores das respostas a agonistas dependentes do endotélio são reduzidas com a idade, enquanto que a resposta

a nitrovasodiladores exógenos mantém-se inalterada em animais mais velhos (Cernadas et al., 1998; Asai et al., 2000). Uma das explicações para tal ocorrência se dá pela descoberta de que a expressão da NOS endotelial ou da atividade desta enzima é reduzida nos animais senescentes. A liberação basal de NO e a expressão da guanilato ciclase solúvel em células do músculo liso vascular também são reduzidas, assim como a capacidade dessas células para produzir GMPc. Deve-se notar, no entanto, que tais mudanças não foram observados por todos os investigadores (Challah et al., 1997; Cernadas et al., 1998; Kloss et al., 2000).

No sistema cardiovascular, durante o envelhecimento, as células musculares, em geral, mostram lento declínio em número, força e velocidade de contração (Grimby & Saltin, 1983). Tanto em ratos como em humanos, o número de células do miocárdio diminui com a idade, embora a hipertrofia compensatória possa regenerar a massa ventricular (Anversa et al., 1990). Ocorre, ainda, lento declínio na complacência ou distensibilidade do tecido cardíaco afetando de forma importante o sistema cardiovascular (Kovanen & Suominen, 1989).

Um ventrículo menos complacente terá uma menor pressão diastólica final e seu enchimento será prejudicado. Se o relaxamento ventricular está comprometido, como ocorre em algumas formas de insuficiência cardíaca, a complacência funcional ventricular também estará reduzida comprometendo o enchimento ventricular.

Existem algumas diferenças e semelhanças entre o coração senescente normal e o coração com sobrecarga. A sobrecarga cardíaca tem sido frequentemente associada com um coração prematuramente envelhecido, o que é obviamente incorreta tal associação (Besse et al., 1994)). Do ponto de vista biológico, as modificações resultantes da senescência do coração podem ser ocasionadas por três fatores diferentes, incluindo o

processo geral do envelhecimento, o envelhecimento do sistema endócrino com aumento dos níveis de cortisol e diminuição de tiroxina livre, e sobretudo, o envelhecimento dos vasos com endurecimento da aorta (Vlachopoulos et al., 2010), que cria uma sobrecarga no ventrículo esquerdo (Swynghedaw, 1999).

As manifestações da doença cardíaca hipertensiva e do envelhecimento do coração são similares. Estes dados podem sugerir a ocorrência de efeitos somatórios do envelhecimento e da HAS sobre o sistema cardiovascular.

6.6. Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia ventricular se desenvolve em resposta a diversas formas de estresse cardíaco, incluindo o aumento da pressão arterial, do volume de sobrecarga, da perda de massa contrátil por infarto prévio, da ativação neuroendócrina e de mutações em genes que codificam proteínas do sarcômero (Berenji et al., 2005). A hipertrofia cardíaca irá adaptar este órgão às novas condições de trabalho multiplicando as unidades contráteis e reduzindo o estresse da parede do coração de acordo com a lei de Laplace (Swynghedaw, 1999).

O crescimento hipertrófico é compensatório para diminuir o estresse da parede do coração e o consumo de oxigênio, mas alguns estudos têm estabelecido a hipertrofia ventricular como um fator de risco por desenvolver insuficiência cardíaca crônica (Levy et al., 1996), mostrando que a hipertrofia apresenta consequências inadequadas ao sistema cardiovascular.

Hipertrofia é definida como o aumento de um órgão devido ao aumento no tamanho das suas células. A hipertrofia cardíaca fisiológica ocorre normalmente durante o crescimento, a gravidez e em resposta ao treinamento físico. Na hipertrofia fisiológica, a

estrutura e a função cardíaca são normais e não há associação com insuficiência cardíaca clínica (Lorell & Carabello, 2000).

Em contraste, a hipertrofia patológica é resultado do estresse biomecânico ou neuro-humoral. Se desenvolve em pacientes com hipertensão, obesidade, doença cardíaca valvular, infarto prévio ou como resultado de mutações nos genes que codificam várias proteínas contráteis (Bauml & Underwood, 2010).

A hipertrofia patológica é caracterizada por alterações metabólicas, estruturais, e remodelamento funcional do coração. Estas alterações podem incluir mudança na direção do metabolismo glicolítico, alterações na manipulação de cálcio e contratilidade, a perda de miócitos com substituição fibrótica (Swynghedaw, 1999), disfunção sistólica ou diastólica, remodelação elétrica, arritmogênese, risco elevado de falência cardíaca e morte súbita (Berenji et al., 2005; Bauml & Underwood, 2010).

Classicamente, o crescimento hipertrófico do coração é dividido em três padrões morfológicos (Ganau et al., 1992; Cohn, 1995): remodelamento concêntrico (aumento da espessura relativa da parede ventricular, mas com massa cardíaca normal), hipertrofia concêntrica (aumento da espessura relativa da parede e da massa cardíaca com pouco ou nenhuma alteração no volume da câmara) e hipertrofia excêntrica (aumento da massa cardíaca com aumento do volume da câmara; espessura relativa da parede pode ser normal, diminuída ou aumentada).

6.7. Rato espontaneamente hipertenso (SHR).

Modelos experimentais são amplamente utilizados em estudos sobre as alterações que ocorrem no sistema cardiovascular induzidas pela hipertensão arterial. O rato SHR é o modelo que mais se aproxima da hipertensão arterial essencial humana, pois apresenta

características similares como aumento da resistência periférica total e do débito cardíaco normal, com volemia normal ou levemente reduzida e da progressiva hipertrofia ventricular esquerda (Pinto et al., 1998).

SHRs eram animais da cepa Wistar Kyoto que, ao apresentarem hipertensão arterial, foram sucessivamente selecionados por endocruzamento entre portadores de hipertensão arterial (Kurtz & Morris. 1987). Os SHRs começam a desenvolver aumento da pressão arterial entre a 6ª e 8ª semanas de vida, apresentando nível de pressão considerada como hipertensão entre a 8ª e a 14ª semanas, atingindo um platô entre a 20ª e 28ª semanas (Yamori, 1984).

Ratos machos dessa cepa são amplamente estudados; entretanto, as fêmeas de SHR passaram a ser alvo de interesse científico desde que Fortepiani e colaboradores (2003) descreveram como possível modelo de hipertensão na menopausa, muito semelhante ao encontrado em mulheres.

Ratas SHR, após a cessação dos ciclos (aproximadamente 12 meses de idade), apresentam aumento significativo da pressão arterial média no 8º e 18º mês (162 mmHg e 180 mmHg, respectivamente), ultrapassando os valores de PA de ratos SHR de mesma idade (175 mmHg e 176 mmHg, respectivamente) (Fortepiani et al., 2003; Reckelhoff & Fortepiani, 2004). Entretanto, Fortepiani e colaboradores (2003) não observaram alterações significativas na pressão arterial média dessas fêmeas antes de completarem 12 meses e entrarem na menopausa. Resultados semelhantes são encontrados em estudos relacionando homens e mulheres (Burl et al., 1995). Outras características desse modelo também se assemelham à menopausa encontrada em mulheres (Schunkert et al., 1997; Burger et al., 2002) como, por exemplo, os níveis de estradiol reduzidos e o aumento da

atividade da renina plasmática, da testosterona sérica (400%), do estresse oxidativo e dos níveis de F₂-isoprostanos (malondialdeídos) (Fortepiani et al., 2003; Wynne et al., 2004).

Fortepiani e colaboradores (2003) também observaram que ratas SHR apresentaram diminuição dos níveis de estradiol e aumento de testosterona a partir dos 12 meses e cessação completa somente com 18 meses compatíveis com o estado de menopausa. Esse resultado foi importante para o estudo de Barros e colaboradores (2011) porque, com as primeiras alterações significativas observadas aos 6 meses de idade, os autores puderam excluir a participação estrogênica nas alterações eletrocardiográficas e hemodinâmicas encontradas nos grupos experimentais com fêmeas SHR.

Yanes e colaboradores (2010) verificaram que a hipertensão em SHR de 8 meses de idade, machos e fêmeas, é, predominantemente, mediada pelo sistema renina angiotensina, sem excluir a possibilidade de participação de outros mecanismos.

De fato, Lopez-Ruiz e colaboradores (2008) observaram o importante papel da testosterona em ratas SHR senescentes no desenvolvimento do quadro de hipertensão arterial. Nesse trabalho, foram determinados os níveis de testosterona plasmática durante períodos do envelhecimento de ratos machos e fêmeas (a partir do 8º até completarem o 16º mês de idade) submetidos ao tratamento com vitaminas E, C ou tempol (antioxidante similar à enzima superóxido dismutase). Os autores observaram que as vitaminas E e C, mas não o tempol, reduziram os níveis de testosterona plasmática em machos e fêmeas. Nas fêmeas a redução da testosterona plasmática foi acompanhada de diminuição da pressão arterial média (PAM), demonstrando que é o aumento dos níveis de testosterona, e não a diminuição do estradiol, o fator responsável pelo desenvolvimento da hipertensão arterial nesse modelo experimental.

Em ratas SHR senescentes (a partir do 18º mes de idade), observa-se redução significativa dos níveis plasmáticos de estradiol. O estradiol tem sido caracterizado como hormônio com propriedades antioxidantes uma vez que, altos níveis de estradiol aumenta a expressão e a atividade das enzimas superóxido dismutase e da glutathione peroxidase, além de diminuir a atividade da enzima NADPH oxidase e produção de superóxido (Ji et al., 2007; Miller et al., 2007).

O estradiol também exerce papel na manutenção da pressão arterial reduzida em alguns modelos animais de hipertensão (Hinojosa-Laborde et al., 2000; Wu et al., 2003). Entretanto, como mencionado acima, para ratas SHR e Dahl (sal sensíveis), apesar das propriedades antioxidantes atribuídas ao estradiol, o aumento da pressão arterial em fêmeas pode ser independente do estresse oxidativo, como observado por Hamilton e colaboradores (2001). Assim, não está claro se o estradiol exógeno ou endógeno exerce efeito protetor contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, na prevenção da hipertensão arterial desse modelo.

Estudos ainda se fazem necessários para esclarecer o papel do estrógeno, bem como de outros fatores coadjuvantes como o sistema renina angiotensina, a testosterona e o estresse oxidativo, nas alterações cardiovasculares observadas no modelo de ratas SHR nas fases pré e pós-menopausa.

7. Capítulo II

Age-Related changes in blood pressure, ventricular parameters and electrical
cardiac activity in female spontaneously hypertensive rats (SHR)

Short Title: Age-related changes in spontaneously hypertensive rats

Trabalho encaminhado para a revista Brazilian Journal of Medical and Biological
Research, cuja forma de apresentação foi respeitada conforme as normas da revista.

Abstract

The present study was performed to determine when the alterations become significant in the blood pressure, electrical cardiac activity, ventricular hemodynamic parameters and left ventricular hypertrophy in females SHR since 3 up to 12 month (n=10), during premenopausal period. Since the 3rd until 12th month, the animals were submitted to acute ECG studies under anesthesia. At 6 month, we observed the first significant change in ECG, characterized by increase in QRS complex duration (12 ± 0.6 , 17 ± 1.2 and 20 ± 0.9 ms, respectively for 3, 6 and 12 month-old), QT (29 ± 0.5 , 43 ± 3 and 58 ± 5 ms) and QTc interval (73 ± 2 , 102 ± 2 and 141 ± 12 ms). We observed significant rise of systolic (118 ± 1 , 131 ± 4 and 136 ± 3 mmHg), mean arterial (106 ± 2 , 113 ± 3 and 122 ± 4 mmHg) and pulse pressure (14 ± 1 , 26 ± 4 and 28 ± 3 mmHg). At 12 months, the cardiomyocyte surface area had an increase of almost 100% when compared to 3 months (6230 ± 336 vs $12055 \pm 682 \mu\text{m}^2$). Even as we observed an increase in +dP/dt: 1197 ± 146 , 3378 ± 555 and 3649 ± 718 (mmHg/s) and -dP/dt: -16 ± 2 , -43 ± 6 and -53 ± 7 (mmHg/s). In conclusion, female SHR 6 month-old, showed cardiac changes triggered by arterial hypertension associated with aging and are not necessarily related to menopause, since this phase of the reproductive cycle occurs after 12 months.

Introduction

Age is a primary risk factor for cardiovascular diseases and with an increase in the absolute number and proportion of the population at an older age in many countries, the mechanisms by which ageing increases cardiovascular risk are increasingly relevant social and economic concern ¹.

Blood pressure (BP) increases after menopause in women such that the prevalence of hypertension becomes higher in women than men like have been observed by many authors ²⁻⁴. Patients with high blood pressure frequently have abnormalities of cardiac structure or function, including left ventricular hypertrophy, systolic and diastolic dysfunction and in extreme cases, overt heart failure. There may also be concomitant or related an increase risk of arrhythmias and sudden death ⁵.

The elucidation of mechanisms responsible for postmenopausal hypertension has been stunted by lack of an animal model. Sheep, rabbits, nonhuman primates, rats and mice have been used as models of various menopausal changes, however, in these animals there were no model of naturally postmenopausal hypertension ⁶.

In 2003, Fortepiani⁷ and colleagues presented a rat model of postmenopausal hypertension, the aging female spontaneously hypertensive rat (SHR), which is noncycling, has low serum estradiol, increased oxidative stress and BP to compare with that premenopausal state. In addition, there is a sex difference in BP in SHR with males typically having higher BP than that of females⁸, similarly to that observed in humans.

Thus, the present study, is perform to determine when the alterations become significant in the BP, evaluate electrical cardiac activity from the surface electrocardiogram (ECG) in females SHR and correlating these changes with age.

Material and Methods

Rats

Female SHR, aged 8 weeks, were obtained from CEMIB – UNICAMP.

The protocols were in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas) as a protocol number 1652-2.

Electrocardiogram

Young SHR (3 month-old, n=10) were kept under standard conditions including a 12 hours on/off light cycle, commercial diet, and water *ad libitum*, until reaching postmenopause at 12 months-old.

At the end of 3 until 12 month period, the animals were submitted to acute ECG studies under anesthesia (100mg/Kg body ketamine and 5 mg/Kg body xylazine; *i. m.*). Body surface ECGs were made with rats in the supine position. ECGs were recorded using 3 subcutaneously placed needle electrodes: one on each limb. Data were obtained in D₂ using a PowerLab setup (AD Instruments, Colorado Springs, Colo)⁹.

Blood Pressure Measurement

Animals of each group (3, 6 and 12 months old, n=5) were anesthetized and the right femoral was exposed, catheterized with a PE-50 polyethylene tube that was connected to a pressure transducer (AD Instruments, Australia). Hemodynamic variables were calculated using the Blood Pressure module and the following ventricular parameters were calculated: heart rate (HR; bpm), end-diastolic pressure (EDP; mmHg), maximum

change of pressure with time (dP/dt -max; mmHg/sec), minimum first time-derivative of pressure (dP/dt -min; mmHg/sec), contractility index max dP/dt divided by the pressure at the time of max dP/dt , IRP average dP/dt , regression of dP/dt versus pressure (Tau; msec) and the arterial parameters were also measured, systolic, diastolic, pulse pressure, ejection and non-ejection duration. Hemodynamic data were analyzed off-line with PowerLab software (AD Instruments, Colorado Springs, Colo, USA)¹⁰.

Cardiomyocyte morphology

The rats were anesthetized and the hearts were excised, trimmed of excess tissue, and arrested with potassium chloride in NaCl 0,9%. Hearts were then fixed by retrograde perfusion with 10% formaldehyde and before histological process, hearts were washed gently three times with a phosphate-buffered saline (PBS) solution and then embedded in paraffin. Approximately three serial, transverse sections of 4 μ m were obtained from the midventricular region of the heart and stained with hematoxylin-eosin (HE) which were used for morphological analysis and measurement of cross-sectional areas of myocytes, using LEICA DM LS microscope, 40X objective, coupled to a video camera to obtain digital images which were analyzed by software Image Pro 3.01 version (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Cardiomyocyte surface area

Cardiomyocyte surface area (CSA) was measured by tracing the outlines of round to ovoid nucleated myocytes (40X) from the myocardial cross sections. A micrometer was utilized to set the scale (micrometer-to-pixel ratio) before the analysis of each segment. The digitized pictures were analyzed using the Image J program¹¹.

Statistics

Data are reported as means $\pm$ SD. For ECG parameters, arterial, ventricular pressure and cardiomyocyte surface area data, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons Test was performed to evaluate the effect of age.

Results

The ECG parameters are presented in Table 1. The heart rate (HR) is significantly higher in female 6 month-old and 12 month-old when compare to 3 month-old ($P < 0.05$), PR intervals, RR interval and the R amplitude do not differ significantly among groups. P wave length is significantly larger in older rats (12 month-old) than in young rats (3 month-old).

The Q amplitude is significantly higher in female 6 month-old and 12 month-old when compare to 3 month-old ($P < 0.05$).

The fig. 1 shows a significantly increase in the QRS complex among 3 and 6 month group (12 ± 0.6 ms versus 17 ± 1.2 ms) and 3 and 12 month group (20 ± 0.9 ms). The interval QT shows significant increase among all groups (29 ± 0.5 ms, 43 ± 3 ms and 58 ± 5 ms, respectively). The QTc interval also presents significant differences among all groups (73 ± 2 ms, 102 ± 2 ms and 141 ± 12 ms, respectively).

The fig.2 shows the average representative ECG recordings of female SHR with 3 (A), 6 (B) and 12 month-old (C, D) groups. The group A has the typical form ECG with all components present: depolarization of the atria (P wave); PR interval, defined as the interval between the apex of the P wave and the Q wave (beginning of QRS complex) and depolarization of the ventricles (QRS complex). In small rodents, the T wave is partially

superimposed upon the termination of the QRS complex, but with the precise equipment, it is possible to detect any variation on QRS complex, S-T segment or T wave. In animals 6 month-old (B), we observed that ST segment shows a depression and the T wave has reduced amplitude, presenting the inverted shape in C and D. The complex QRS is extended in C and D, with a modifying in its morphology characterized by a dicrotic notch in relation to group A.

Systolic pressure is shown in fig.3 (A), rats 6 and 12 month-old showed significantly increase (131 ± 4 mmHg and 136 ± 3 mmHg, respectively) when compared to rats with 3 month-old (118 ± 1 mmHg). The mean arterial pressure (MAP) also showed significant increase among all groups (106 ± 2 mmHg, 113 ± 3 mmHg and 122 ± 4 mmHg, respectively), pulse pressure showed significant difference between 3 and 6 month (14 ± 1 mmHg versus 26 ± 4 mmHg) and 3 vs 12 month (28 ± 3 mmHg) and dicrotic notch pressure showed significantly increase between 3 and 12 month-old (116 ± 1 mmHg vs 127 ± 2 mmHg), but not in 6 month-old (124 ± 4 mmHg).

The Fig 3 (B) shows the arterial parameters. The non-ejection duration, which represents the diastole period, showed significant increment among 3 month and 6 month groups (66 ± 1 ms versus 81 ± 6 ms) and 12 month group (95 ± 9 ms). The ejection duration (systole period) shows significantly increased in rats 12 month-old when compared to rats with 3 months (116 ± 4 ms vs 77 ± 1) but not when compared to 6 month (104 ± 3). Similarly, we observed increase for cycle duration (156 ± 2 ms, 178 ± 8 ms and 206 ± 23 ms, respectively 3, 6 and 12 month-old).

Table 2 illustrates the heart performance in SHR rats with 3, 6 and 12 month-old. SHR with 6 and 12 month shows greater pressures than SHR 3 month-old. Maximum change of pressure with time (dP/dt -max; mmHg/sec), the minimum first time-derivative of

pressure (dP/dt-min; mmHg/sec) and the Contractility Index (CI) show significant increase in SHR with 6 and 12 month-old when compared to SHR 3 month. The regression of dP/dt versus pressure (Tau; msec), that represents lusitropic function is greater in SHR 6 month and decreases significantly in SHR 12 month. The parameters End-Diastolic pressure (EDP) and Isovolumic Relaxation Period used for estimation of tau (IRP) did not show significant alterations.

The Fig 4E shows the age effect in the cardiomyocyte morphology. Female SHR with 6 (B) and 12 (C, D) month-old had an increase in cell size that can be quantified by Image J program shows a significantly increase in cell surface area (E) among all groups ($6230 \pm 336 \mu\text{m}^2$, $8528 \pm 425 \mu\text{m}^2$ and $12055 \pm 682 \mu\text{m}^2$, respectively). In Figure 5D it was possibly recognized a leukocyte infiltration within the area highlighted.

Discussion

Aging is a unique and an inexorable process characterized by a gradual reduction of the capacity of many systems to perform effectively its functions associated with the lifestyle of the individual. The cardiovascular system consists of several components and has a dynamic interaction, making it difficult to define the changes of aging from those caused by diseases.

It is known that with advancing age, the cardiomyocytes decrease in number and suffer hypertrophy¹². This hypertrophy results from an increase in afterload associated with aging, primarily due to arterial stiffening. The chronic loss of myocytes reduces the ability of the senescent heart withstand variations or increase of blood pressure and ventricular volume overload¹³.

Experimental models are widely used in studies about the pathophysiology of cardiac remodeling induced by hypertension. The spontaneously hypertensive rats (SHR) is the model that most closely matches the human essential hypertension, as it has similar characteristics as increased total peripheral resistance, cardiac output and progressive left ventricular hypertrophy¹⁴.

The SHR develop high blood pressure between 6 and 8 weeks-old with in a level regarded as high blood pressure between the 8th and 14th week (3 month), reaching a plateau between the 20th and 28th weeks (6 month)¹⁵.

Exactly what we find in our results, SHR with 6 month-old showed significantly increase of systolic pressure (SP), mean arterial pressure (MAP) and pulse pressure (PP) accompanied by significant changes in ECG parameters. The increase in the QRS complex in females with 6 and 12 month-old, is indicative of changes in ventricular conduction due to, probably, the overload in left ventricle. In addition, change in QRS morphology, suggested the presence of a ventricular blockage¹⁶.

Thus, the depolarization separately from each ventricle, producing two QRS complexes in the same ECG, generates the dicrotic notch. This fact may have contributed to the extension, although not significant, of the PR interval in these groups.

Moreover, the increase in QT and QTc interval observed in the present study in rats with 6 month age has not been described before in this model, maybe consequently to the left ventricular hypertrophy triggered by hypertension observed in SHR aged group.

Histological findings of the myocardium allowed to observe an increase in the area of cardiomyocytes in animals 6 and 12 months characterizing left ventricular hypertrophy in these groups, in addition to evidence of inflammation in the group of 12 month, as evidenced by lymphocytic infiltration in the myocardium, probably as much as

the hypertrophy of the aging process. Thus, the prolongation of QT and QTc signal for risk of sudden death in old SHR groups.

Even so, the presence of leukocyte infiltration showed an area with inflammatory cells suggesting a myocarditis or cardiac ischemia. The T wave recorded in animals with 6 and 12 month-old and associated with ST-segment depression may be the consequent processes of ventricular ischemia¹⁷. The ST-segment depression may have been caused by an anomalous vector originating from ventricular region due to an ischemic process. In fact, the record chart in the subepicardial ischemia results in a T-wave opposite to the direction of activation of the ventricles in the region that suffered ischemia.

The systolic (+dp/dt), diastolic (-dp/dt) function and the contractility index showed better performance of the hypertrophic heart compared to the SRH 3 months¹⁸. However, the left ventricular isovolumic pressure decay (tau) in the rats with 12 month old failed to less than younger rats, compromising the lusitropic function¹⁹. Among the agents that contributed to the mechanical dysfunction and ventricular systolic and diastolic blood pressure observed in SHR groups 6 and 12 months there are hypertension, ventricular hypertrophy and left ventricular hemodynamic overload pressure. The compensation to pressure overload was done initially by means of ventricular hypertrophy resulting from increased volume of left ventricular cardiomyocytes. With respect to progression of hypertrophy, there is increased force of contraction (+ dp / dt) and diastolic blood pressure (-dP/dt), causing the stretching of myocardial fibers. According to the Frank-Starling law, this stretch causes increased ventricular contractile force to offset the high diastolic pressure, and the longer the same, the greater the myocardial contractility (IC) to the physical limit of elasticity of the fibers²⁰. Once beyond this threshold is observed decrease in ventricular lusitropic activity (Tau). In conclusion, female SHR from 6 months-old,

have cardiac changes triggered by arterial hypertension associated with aging and are not necessarily related to menopause, since this phase of the reproductive cycle occurs after 12 months of age in this experimental model .

Acknowledgments

This study was supported by CAPES.

References

1. Gates PE, Strain WD, Shore AC (2008). Human endothelial function and microvascular ageing. *Exp. Physiol.* 94.3: 311-316.
2. Wimber N, Hoegholm A, Christenden H, Bang L, Mikkelsen K, Nielsen P, Svendsen T, Kampmann J, Madsen N, Bentzon M (1995). 24-h Ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subject, related to age and gender. *Am. J. Hypertension* 8: 978-986.
3. Reckelhoff JF, ZhangH, Srivastava K (2000). Gender differences in the development of hypertension in SHR: Role of the rennin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 480-483.
4. Reckelhoff JF (2001). Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37: 1199-1208.
5. Tin LL, Beevers G, Lip GYH (2002). Hypertension, left ventricular hypertrophy and sudden death. *Current Cardiology Reports* 4: 449-457.
6. Reckelhoff JF, Fortepiani LA (2004). Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension*, 43: 918-923.
7. Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts II LJ, Reckelhoff JF (2003). Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 41: 640-645.
8. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP (1999). Gender differences in hypertension in spontaneously rats: Role of androgens and androgen receptor. *Hypertension* 34: 920-923.

9. Henkens IR, Mouchaers KTB, Vliegen HW, van der Laarse WJ, Swenne CA, Maan AC, Draisma HHM, Schalij I, van der Wall EE, Schalij MJ, Vonk-Noordegraaf A (2007). Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1300–H1307.
10. Givertz MM, Andreou C, Conrad CH, Colucci WS (2007). Direct Myocardial Effects of Levosimendan in Humans With Left Ventricular Dysfunction. *Circulation*, 115:1218-1224.
11. Grimm D, Cameron D, Griesse DP, Riegger GA, Kromer EP (1998). Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 40: 297– 306.
12. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R (1996). Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fisher rats *Am J Physiol* 271(Heart Circ Physiol (49): H1215-28.
13. Wei JY, Gersh BJ (1987).Heart disease in the elderly. *Curr Prob Cardiol* 12: 1-65.
14. Pinto Y, Paul M, Ganten D (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 39: 77-88.
15. Yamori Y (1984). Animal models for hypertension. *Nippon Rinsho.* 42: 258-70.
16. Sgarbossa EB, Pinski SL, Topol EJ, Califf RM, Barbagelata A, Goodman SG (1998). Acute myocardial infarction and complete bundle branch block at hospital admission: Clinical characteristics and outcome in the thrombolytic era. *J Am Coll Cardiol* 31: 105–110.

17. Diederik Boon, Jeroen van Goudoever, Jan J. Piek, Gert A. van Montfrans (2003). ST Segment Depression Criteria and the Prevalence of Silent Cardiac Ischemia in Hypertensives. *Hypertension*. 41: 476-481.
18. Nakatani S, Garcia MJ, Firstenberg MS, Rodriguez L, Grimm RA, Greenberg NL, McCarthy PM, Vandervoort PM, Thomas JD (1999). Noninvasive Assessment of Left Atrial Maximum dP/dt by a Combination of Transmitral and Pulmonary Venous Flow. *J.Am. Col. Cardiol.* (34): 795-801.
19. Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich E (2004). Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286:H181-5.
20. Ju M, Juichiro S, Satoshi M, Junichi A, Kazuo H (2007). Hypovolemia does not affect speed of isovolumic left ventricular contraction and relaxation in excised canine heart. *Shock* 29(3): 395-401.

Tab.1 Comparison of ECG parameters between female SHR with 3, 6 and 12 month-old.

	3 rd month	6 th month	12 th month
RR intervals (ms)	204 ± 1	210 ± 20	226 ± 40
P wave lenght (ms)	15 ± 0.7	17 ± 0.9	20 ± 1.2 *
PR intervals (ms)	46 ± 1	48 ± 3	51 ± 2 *
Q amplitude (mv)	0.03 ± 0.01	0.035 ± 0.02 ▪	0.04 ± 0.02 *
R amplitude (mv)	0.52 ± 0.07	0.53 ± 0.16	0.81 ± 0.08 * °
ST amplitude (mv)	-0.05 ± 0.02	-0.02 ± 0.03	-0.05 ± 0.01
HR (bpm)	303 ± 31	374 ± 48 ▪	392 ± 36 *

Data are expressed as mean ± SD, minimal number per group equal 5). * P< 0.05, 3 month vs 12 month; ▪ P < 0.05, 3 month vs 6 month; ° P , 0.05, 6 month vs 12 month.

Tab2. Cardiac analysis of different ages female SHR.

	3 th month	6 th month	12 th month
Max pressure (mmHg)	119 ± 2	130 ± 4 ■	139 ± 2 *
Min pressure (mmHg)	-1.65 ± 0.01	-1.64 ± 0.06	-1.75 ± 0.07 *
EDP (mmHg)	2.45 ± 0.01	2.41 ± 0.08	2.59 ± 0.10
Max dP/dt (mmHg/s)	1197 ± 146	3378 ± 555 ■	3649 ± 718 *
Contractility index (1/s)	14 ± 2	38 ± 6 ■	39 ± 8 *
Min dP/dt (mmHg)	-16 ± 2	-43 ± 6 ■	-53 ± 7 *
IRP Average dP/dt (mmHg/s)	-4849 ± 255	-4880 ± 703	-6298 ± 468 * °
Tau (s)	0.0095 ± 0.0007	0.0117 ± 0.0009 ■	0.0082 ± 0.0008 * °

Data are presented as means ± SD; *n* = 5. Max pressure (systolic), Min pressure (diastolic), EDP (end-diastolic pressure); Contractility index; IRP Average; tau, time constant of isovolumic pressure relaxation; $\pm dP/dt$, maximal rate of positive and negative change in left ventricular pressure. * *P* < 0.05, 3 vs 12 month; ■ *P* < 0.05, 3 vs 6 month; ° *P* < 0.05, 6 vs 12 month.

Legends:

Fig.1. Comparison of QRS complex, QT interval and QTc with age; female SHR with 3, 6 and 12 month-old (n=5). * P< 0.05, 3 vs 12 month; ■ P < 0.05, 3 vs 6 month; ° P < 0.05, 6 vs 12 month.

Fig.2.Example of signal-average ECG waveforms recorded by PowerLab-ADInstruments of the 3 groups of female SHR: A – 3 month old; B – 6 month old and C1, D – 12 month old.

Fig. 3 Measures of Systolic pressure (SP), Mean arterial pressure (MAP), Pulse pressure (PP) and Dicrotic notch pressure (DNP) in mmHg in different age (A). Ejection duration (ED), Non ejection duration (NED) and cycle duration (CD) in ms analysed age (B). Groups of female SHR with 3 month-old, 6 month-old and 12 month-old (n=5). * P < 0.05, 3 vs 12 month; ■ P < 0.05, 3 vs 6 month and ° P < 0.05, 6 vs 12 month.

Fig 4. Transversal left ventricular tissue sections from female SHR with 3 month-old (A), 6 month-old (B) and 12 month-old (C). All sections are stained with hematoxylin-eosin (HE) and viewed at the same magnification (x40). Cardiomyocyte surface area in μm^2 of 3 groups (E): * P < 0.05, 3 vs 12 month; ■ P < 0.05, 3 vs 6 month and ° P < 0.05, 6 vs 12 month.

Figure 1.

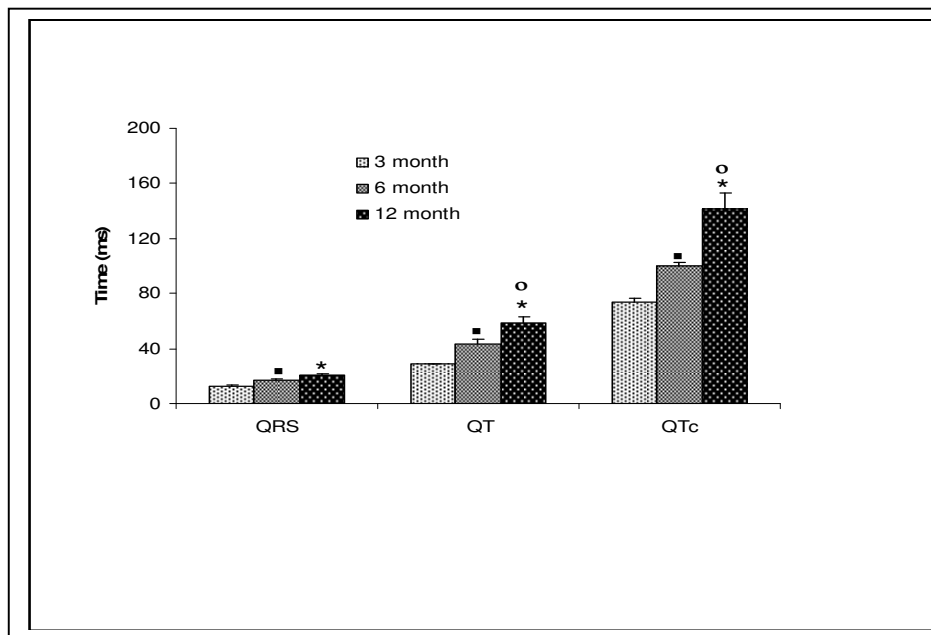


Figure 2

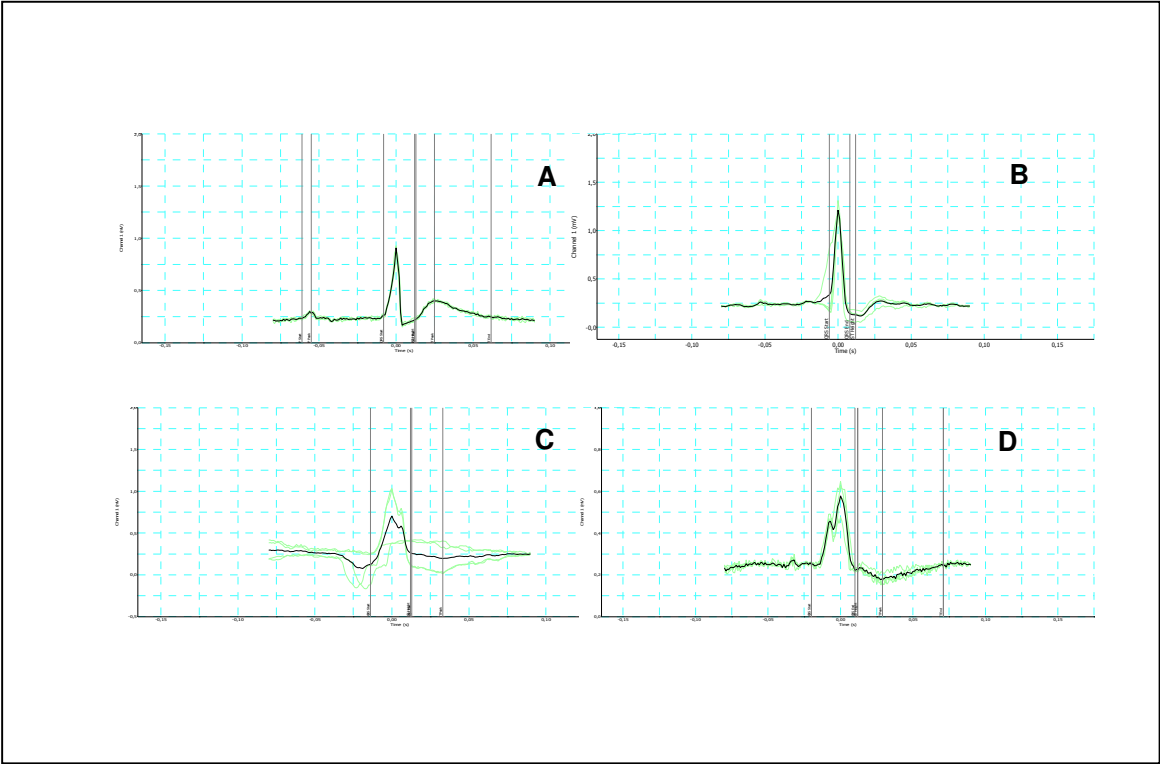


Figure 3

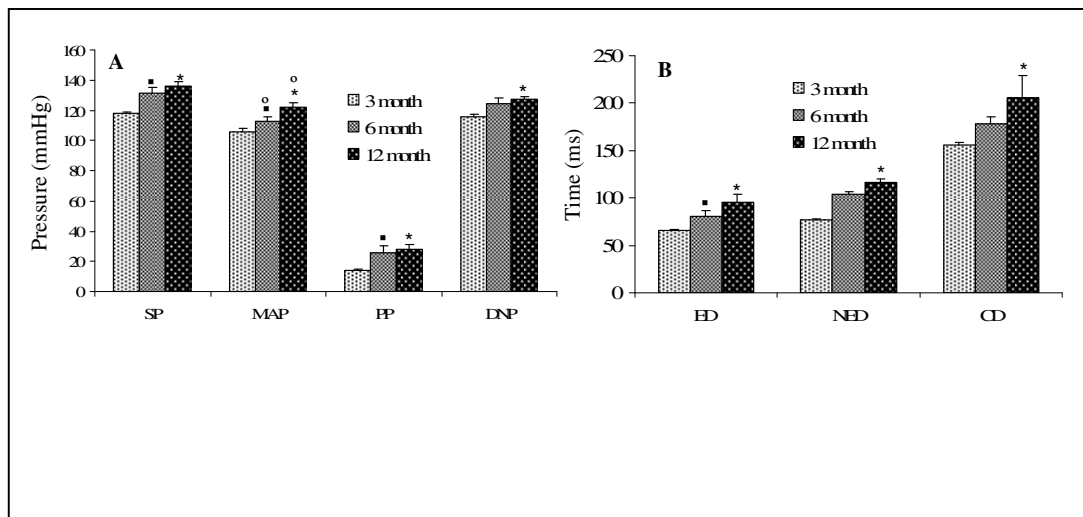


Figure 4

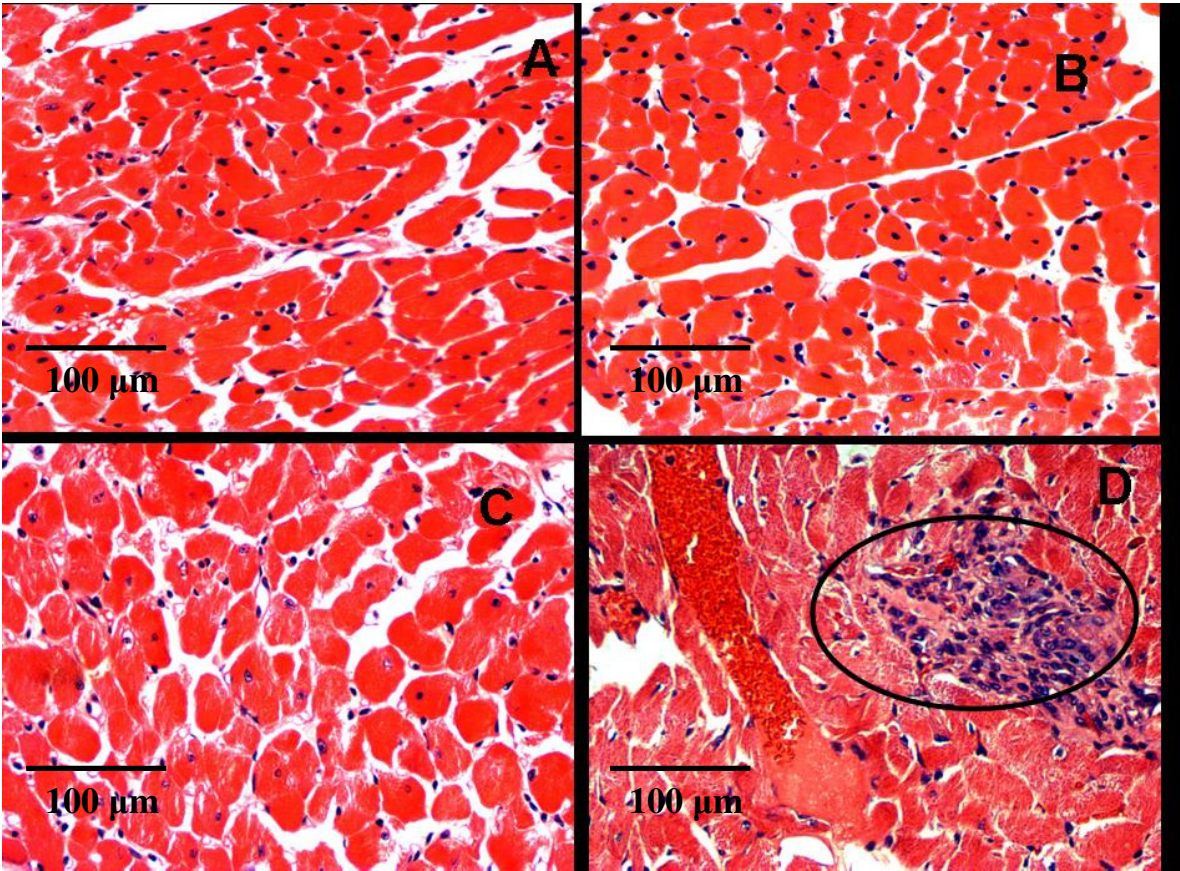
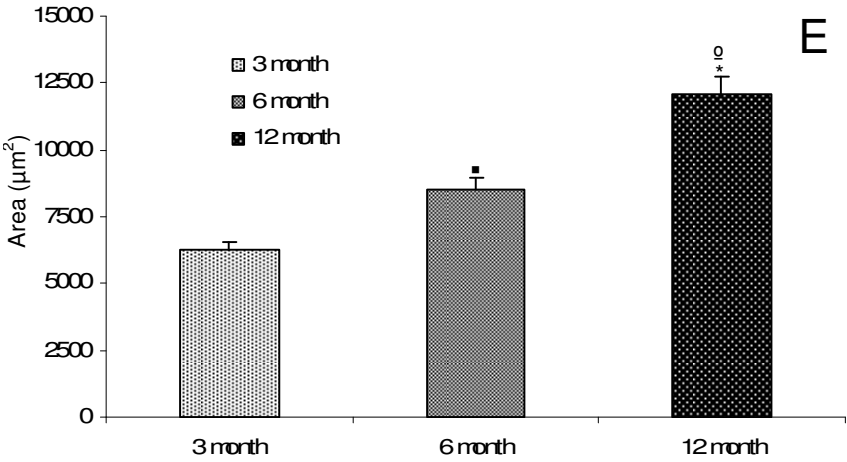


Figure 4E



8. Capítulo III

Hipertensão arterial altera a variabilidade da frequência cardíaca em ratas SHR no período pré-menopausa

Short title: variabilidade da frequência cardíaca em ratas SHR

Trabalho será encaminhado para a revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

8.1. Introdução

8.1.1. Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e Sistema Nervoso Autônomo

O controle do sistema cardiovascular é realizado, em parte, pelo sistema nervoso autônomo (SNA), através de terminações simpáticas por todo o miocárdio e parassimpáticas para os nódulos sinusal e atrioventricular (Aubert et al, 2003). A influência do SNA sobre o coração está associada às informações dos baroreceptores, quimioceptores, mecanoreceptores atriais e ventriculares, frequência respiratória, neurônios vasomotores do bulbo, sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistema termorregulador hipotalâmico (Rajendra et al, 2006). Este controle autonômico está intimamente associado à frequência cardíaca (FC), adaptando-a as variações das condições orgânicas a cada momento (Vanderlei et al, 2009).

O aumento da FC é decorrente da maior atividade simpática e/ou da menor atividade parassimpática, enquanto que a predominância da atividade parassimpática constitui-se no fator fundamental para a sua redução.

Alterações na FC, definidas como Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC), são absolutamente normais e indica a capacidade do coração em se adaptar aos diversos estímulos endógenos e ambientais, tais como, respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e alterações orgânicas induzidas por estados mórbidos (Caruana-Montaldo et al, 2000; Rajendra et al, 2006).

Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) é a variação do tempo entre batimentos cardíacos consecutivos sequenciais (intervalos R-R, caso a frequência cardíaca seja determinada pelo registro eletrocardiográfico), sujeitos às influências do SNA sobre o

nódulo sinusal. Num eletrocardiograma (ECG) a maior deflexão de um complexo QRS normal é o pico da onda R, e a duração entre os picos de duas ondas R adjacente, é denominada intervalo R-R (Reed et al, 2005).

Dessa forma, VFC é o resultado do equilíbrio entre a ação de mediadores simpáticos (adrenalina e noradrenalina) e parassimpáticos (acetilcolina) sobre a frequência cardíaca. Os mediadores simpáticos atuam sobre os nodos sino atrial e atrioventricular aumentando, além da frequência cardíaca, a força de contração e a velocidade de condução do impulso para o nodo atrioventricular, enquanto a acetilcolina, neurotransmissor parassimpático, reduz a frequência cardíaca e a velocidade de condução do impulso para o nodo atrioventricular.

A análise da VFC trata-se de um método não-invasivo, que pode ser utilizado para identificar fenômenos relacionados ao SNA em indivíduos saudáveis, atletas e portadores de doenças (Task Force,1996; Pumpila et al, 2002). Wolf e colaboradores (1977) demonstraram a correlação entre redução na VFC e maior risco de mortalidade após infarto agudo do miocárdio. Kleiger e colaboradores (1987) confirmaram que a VFC era um potente e independente índice preditor de mortalidade após infarto agudo do miocárdio.

Assim, alterações nos padrões da VFC constituem-se num indicador sensível e antecipado de problemas na saúde. Alta VFC é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável com mecanismos autonômicos eficientes (Chatzimichali et al, 2011). Por outro lado, baixa VFC é um indicador de um processo anormal e insuficiente de adaptação do SNA, o que pode indicar alterações anormais nos processos fisiológicos do

organismo, necessitando de investigações adicionais para se encontrar um diagnóstico final (Di Iorio et al, 2010; Malmberg et al, 2010).

8.1.2. Determinação da VFC através do registro eletrocardiográfico

A excitação cardíaca inicia-se com um impulso gerado no nódulo sinusal, o qual é distribuído pelos átrios, resultando na despolarização atrial, que é representada no eletrocardiograma (ECG) pela onda P. Este impulso é conduzido aos ventrículos por meio do nódulo atrioventricular e distribuído pelas fibras de Purkinje, resultando na despolarização do septo, ápice e base dos ventrículos, a qual no ECG é representada, respectivamente, pelas ondas Q, R e S, formando o complexo QRS. A repolarização ventricular é representada pela onda T. Os índices de VFC são obtidos pela análise dos intervalos entre as ondas R, as quais podem ser captadas pelo eletrocardiógrafo, a partir de eletrodos colocados em pontos específicos do corpo (Twomey et al, 2010).

8.1.3. Índices de VFC

Para análise da VFC, podem ser utilizados índices obtidos por meio de métodos lineares, no domínio do tempo e da frequência, e métodos não-lineares. Os métodos lineares são divididos em dois tipos: análise no domínio do tempo, realizada por meio de índices estatísticos e geométricos, e análise no domínio da frequência. Para a análise da VFC no domínio do tempo, assim denominada por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos ou segundos), mede-se cada intervalo RR normal (batimentos sinusais) durante determinado intervalo de tempo e, então, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do

mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (Task Force, 1996). Os índices estatísticos, no domínio do tempo, obtidos pela determinação de intervalos RR correspondentes em qualquer ponto no tempo, são (Reed et al, 2005; Rodrigues-Linares, 2010).

- a) **SDNN** - Desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em milissegundos;
- b) **SDANN** - Representa o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em milissegundos;
- c) **SDNNi** - É a média do desvio padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos, expresso em milissegundos;
- d) **rMSSD** - É a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em milissegundos;
- e) **pNN50** - Representa a porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 milissegundos.

Os índices SDNN, SDANN e SDNNi são obtidos a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpática e parassimpática, porém não permitem distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal (Reed et al, 2005; Rodrigues-Linares, 2010)

Já os índices rMSSD e pNN50 representam a atividade parassimpática, pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes. Outra possibilidade de processar intervalos RR no domínio do tempo é a partir de métodos geométricos, sendo o índice triangular e a plotagem de Lorenz (ou Plot de Poincaré) os mais conhecidos. Os

métodos geométricos apresentam os intervalos RR em padrões geométricos e várias aproximações são usadas para derivar as medidas de VFC a partir delas (Reed et al, 2005; Rodrigues-Linares, 2010).

O índice triangular é calculado a partir da construção de um histograma de densidade dos intervalos RR normais, o qual mostra, no eixo horizontal (eixo X), o comprimento dos intervalos RR e, no eixo vertical (eixo Y), a frequência com que cada um deles ocorreu. A união dos pontos das colunas do histograma forma uma figura semelhante a um triângulo e a largura da base deste triângulo expressa a variabilidade dos intervalos RR. O índice triangular (correspondente à base do triângulo) pode ser calculado dividindo-se a área (corresponde ao número total de intervalos RR utilizados para construir a figura) e a altura (corresponde ao número de intervalos RR com frequência modal) do triângulo. Este índice tem uma íntima correlação com o desvio padrão de todos os intervalos RR e não sofre a influência dos batimentos ectópicos e artefatos, pois os mesmos ficam fora do triângulo (Reed et al, 2005; Rodrigues-Linares, 2010).

O plot de Poincaré é um método geométrico para análise da dinâmica da VFC, que representa uma série temporal dentro de um plano cartesiano no qual, cada intervalo RR é correlacionado com o intervalo antecedente e definem um ponto no plot (Vanderlei et al, 2010). A análise do plot de Poincaré pode ser feita de forma qualitativa (visual), por meio da avaliação da figura formada pelo seu atrator, a qual é útil para mostrar o grau de complexidade dos intervalos RR, ou quantitativa, por meio do ajuste da elipse da figura formada pelo atrator, de onde se obtém três índices: SD1, SD2 e a razão SD1/SD2 (Bruneto et al, 2005). O SD1 representa a dispersão dos pontos perpendiculares à linha de identidade e parece ser um índice de registro instantâneo da variabilidade batimento a

batimento; o SD2 representa a dispersão dos pontos ao longo da linha de identidade e representa a VFC em registros de longa duração; a relação de ambos (SD1/SD2) mostra a razão entre as variações curta e longa dos intervalos RR. A análise qualitativa (visual) do plot de Poincaré é feita por meio da análise das figuras formadas pelo atrator do plot, as quais foram descritas por Tulppo et al. (1998), que as classificaram como:

a) figura com característica de um cometa, na qual um aumento na dispersão dos intervalos RR batimento a batimento é observado com aumento nos intervalos RR, característica de um plot normal;

b) figura com característica de um torpedo, com pequena dispersão global batimento a batimento (SD1) e sem aumento da dispersão dos intervalos RR a longoprazo;

c) figura complexa ou parabólica, na qual duas ou mais extremidades distintas são separadas do corpo principal do plot, com pelo menos três pontos incluídos em cada extremidade.

Outro método linear é o domínio da frequência, sendo a densidade de potência espectral a mais utilizada atualmente, quando se trata de estudos com indivíduos em condições de repouso. Esta análise decompõe a VFC em componentes oscilatórios fundamentais, sendo que os principais são (Reed et al, 2005; Rodrigues-Linares, 2010):

- a) Componente de alta frequência (High Frequency - HF), com variação de 0,15 a 0,4Hz, que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação parassimpática sobre o coração;
- b) Componente de baixa frequência (Low Frequency - LF), com variação entre 0,04 e 0,15Hz, que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do sistema nervoso simpático;

- c) Componentes de muito baixa frequência (Very Low Frequency - VLF) e ultrabaixa frequência (Ultra Low Frequency - ULF) - Índices menos utilizados cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico (Novais et al, 2004).

A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre, os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração (Vanderlei et al, 2009).

8.1.4. Variabilidade da Frequência Cardíaca e controle metabólico

Fatores de risco cardiovasculares, como excesso de gordura corporal, hiperglicemia, hipersinsulinemia, elevação nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), pressão arterial sistólica e diastólica, assim como redução nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) estão associados com a redução da VFC (Stutzman et al, 2010).

Neste contexto, a VFC em repouso é uma das medidas comumente utilizadas para estabelecer estas relações, sendo que procedimentos capazes de modificar essas variáveis podem melhorar a regulação autonômica com consequente aumento da VFC.

A atividade parassimpática tende a se associar negativamente com o índice de massa e gordura corporal. A baixa atividade parassimpática é um fator de risco independente para doença arterial coronariana, assim como é um fator predisponente para arritmia e morte súbita em obesos. Além disso, o tônus parassimpático aumenta com a redução de massa corporal em mulheres obesas (Cambri et al. 2008).

Indivíduos hipertensos tendem a ter menor VFC e maior FC de repouso que normotensos; sendo que normotensos com VFC reduzida tendem a apresentar maior risco de desenvolver hipertensão (Sowmya et al, 2010).

Há evidências de que a menopausa reduz a atividade simpato-vagal devido ao aumento da gordura corporal, pressão arterial e perfil lipídico. Estas alterações frequentes na menopausa fazem com que as mulheres apresentem risco cardíaco aumentado, com índices similares aos observados em homens. Neste caso, não são encontradas diferenças entre gêneros na atividade simpato-vagal quando observada pela VFC, diferentemente de adultos jovens, fase em que as mulheres apresentam maior atividade parassimpática que os homens (Smith et al, 2007).

Ratas espontaneamente hipertensas (SHR) constituem-se num importante modelo para o estudo dos efeitos do estrógeno durante o desenvolvimento da hipertensão arterial (Dias et al, 2010). Há diversos estudos mostrando que fêmeas SHR têm menor pressão arterial que os machos da mesma espécie (Fortepiani et al, 2003; Reckelhoff et al, 1998).

Além disso, ratas SHR senescentes têm sido aceitas como um modelo adequado para hipertensão pós-menopausa por duas razões: 1) imediatamente após a interrupção dos ciclos estrais aos 12 meses de idade, aproximadamente, esses animais apresentam redução progressiva dos níveis de estrógeno, de forma semelhante às mulheres; 2) esses animais exibem maiores níveis de pressão arterial do que fêmeas SHR jovens (Fortepiani et al, 2003).

Entretanto, dados da literatura indicam que animais SHR apresentam preponderância do tônus simpático, em relação ao parassimpático, sob condições basais comparados com ratos Wistar (Lundin et al, 1984). É provável que o aumento da atividade simpática observado nesse modelo experimental justifique os resultados verificados por

Tadepalli e colaboradores (1974), os quais observaram que fêmeas SHR jovens (9 a 12 semanas de idade) apresentaram maiores valores para pressão arterial e frequência cardíaca do que ratas Wistar da mesma idade, independente da ausência da ação estrogênica.

De fato, animais SHR começam a desenvolver aumento da pressão arterial entre a 6^a e 8^a semana de vida, apresentando nível de pressão considerada como hipertensão entre a 8^a e a 14^a semana, atingindo um platô entre a 20^a e 28^a semana de idade (Yamori, 1984). Animais SHR constituem-se no modelo experimental que mais se aproxima da hipertensão arterial essencial humana, pois apresenta características similares como aumento da resistência periférica total e progressiva hipertrofia ventricular esquerda.

8.2. OBJETIVOS

Considerando que:

- a) ratas SHR apresentam alterações no ciclo estral a partir dos 12 meses de idade;
- b) ratas SHR apresentam elevação progressiva da pressão arterial a partir dos 3 meses de idade;
- c) Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) é um método capaz de avaliar a ação do sistema nervoso autônomo sobre o coração, constituindo-se num indicador antecipado de problemas cardíacos;

Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade do sistema nervoso autônomo sobre o coração de fêmeas SHR (aos 3, 6 e 12 meses de idade) através da determinação da Variabilidade da Frequência Cardíaca calculada pela análise do eletrocardiograma.

8.3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Fêmeas SHR foram obtidas do CEMIB – UNICAMP, e mantidas em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais com cinco animais em cada grupo:

- a) SHR-3: fêmeas SHR com três meses de idade;
- b) SHR-6: fêmeas SHR com seis meses de idade;
- c) SHR-12: fêmeas SHR com doze meses de idade

Comitê de Ética

Os protocolos estão de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê Institucional para Pesquisa Ética em Animal (Universidade Estadual de Campinas) sob nº 1652-2.

Determinação da pressão arterial.

Os animais foram anestesiados com Ketamina (100mg/Kg peso corpóreo) / xilazina (5 mg/Kg peso corpóreo) via *i. m.* . A artéria femoral direita foi exposta e canulada com tubo de polietileno PE-50 e, posteriormente, conectado a um transdutor de pressão arterial (ADInstruments-Austrália). A pressão sistólica, diastólica e média

foram gravadas por dois minutos e analisadas pelo software PowerLab – ADInstruments).

Análise e Aquisição de dados

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Sinais analógicos de eletrocardiogramas (ECG) de superfície foram gravados, durante cinco minutos, utilizando eletrodos em forma de agulha, implantados subcutaneamente nas extremidades dos membros. Os dados foram obtidos utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab e analisados pelo software Chart 7.0 (ADInstruments – Austrália). Frequência Cardíaca (FC) foi calculada a partir da gravação dos ECG.

Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC), nos domínios do tempo e da frequência.

Índices espectrais da variação da frequência cardíaca foram calculados utilizando o módulo de Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) do software Chart 7.0 (ADInstruments -Austrália). Foram calculados os seguintes índices:

a) No domínio da frequência: relativo às frequências das variações periódicas dos intervalos RR., foram calculados os seguintes índices espectrais, os quais representam parâmetros do espectro de frequências com que se manifestam as variações periódicas de uma série contínua e estacionária de intervalos RR do eletrocardiograma, registrado durante 5 minutos:

a.1) **Total Power** reflete a ação autonômica geral sobre o coração.

a.2) **LF**, faixa de baixa frequência (0,04 – 0,15 Hz), representa ambos os componentes do SNA com a predominância do sistema nervoso simpático.

a.3) **HF**, faixa de alta frequência (0,15 - 0,4 Hz), é indicativo da ação parassimpática sobre o coração.

a.4) **LF/HF** reflete a interação entre os componentes simpáticos e parassimpáticos, determinando o equilíbrio da função autonômica sobre o coração.

b) No domínio do tempo: relativo à duração dos Intervalos RR, foram calculados os seguintes índices temporais., os quais representam parâmetros estatísticos das variações da duração dos intervalos RR do eletrocardiograma, de uma série contínua e estacionária registrada durante determinado período de tempo:

b.1) **SDNN**: média e desvio padrão dos intervalos R-R, representa tanto a atividade simpática quanto parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal

b.2) **RMSSD**: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes em um intervalo de tempo, reflete a modulação parassimpática sobre a frequência cardíaca.

b.3) **pNN50**: indica a porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 milésimos de segundo, representa a atividade parassimpática sobre o coração.

Estatística

Os dados apresentados como média $\pm$ SD, foram analisados estatisticamente pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparação entre as médias. Foi considerado $p < 0,05$ como nível de significância, utilizando-se do software Graph-Pad – Prism.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média dos grupos experimentais.

Tabela 1. Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) das fêmeas SHR com três (SHR-3), seis (SHR-6) e doze (SHR-12) meses de idade.

grupos	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
SHR-3	118 ± 1	87 ± 5	106 ± 2
SHR-6	131 ± 4 ^a	101 ± 6 ^a	113 ± 3 ^a
SHR-12	136 ± 3 ^b	112 ± 5 ^{b c}	122 ± 4 ^{b c}

Os resultados mostraram que os valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média expressos como média $\pm$ desvio padrão; $p < 0,05$ para ^(a) SHR-3 x SHR-6, ^(b) SHR-3 x SHR-12, ^(c) SHR-6 x SHR-12; $n = 5$. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Nossos resultados estão de acordo com Amenta e colaboradores (2010), os quais verificaram que animais SHR, normotensos ao nascimento, desenvolveram hipertensão sustentada a partir dos 3 meses de idade, constituindo-se num dos principais modelos para o estudo e tratamento das consequências da hipertensão.

Tadepalli e colaboradores (1974), Yamori (1984), Reckelhoff e colaboradores (1998), Fortepiani e colaboradores (2003) e Dias e colaboradores (2010), também

observaram elevação da pressão arterial em ratas SHR nos períodos pré e pós-menopausa, em decorrência das características genéticas dessa cepa de ratas.

Segundo Landgraf e colaboradores (2010), animais SHR exibem desequilíbrio na expressão de receptores renais para angiotensina AT1 e AT2 associados a processos inflamatórios contribuindo, assim, para lesões renais em animais adultos e, conseqüentemente, no desenvolvimento da hipertensão arterial. Dessa forma, o sistema renina-angiotensina parece exercer papel fundamental na gênese da hipertensão arterial em animais SHR, nos períodos pré e pós-menopausa.

Por outro lado, a hipertensão arterial constitui-se num fator de risco cardiovascular, independente do sexo e da presença da ação estrogênica.

Avaliamos, então, a relação entre a hipertensão arterial e a atividade autonômica através da determinação da Variabilidade da Frequência Cardíaca, de acordo com registros eletrocardiográficos dos grupos experimentais, para verificar se seria possível prever riscos cardíacos nesse modelo em estudo.

A figura 1 apresenta segmentos dos eletrocardiogramas representativos dos animais dos grupos experimentais obtidos na derivação D₂.

O grupo SHR-3 apresentou eletrocardiograma com registro normal, ou seja, uma única onda P (despolarização atrial) antecedendo um complexo formado pelas ondas Q (despolarização do septo ventricular), R (despolarização do ápice ventricular) e S (despolarização da base ventricular), seguido pela onda T positiva (repolarização ventricular) imediatamente após a onda S. O segmento ST curto, normalmente observado em ratos, ocorre devido à alta frequência cardíaca observada nessa espécie.

Por outro lado, o grupo SHR-6 e, principalmente, o animais SHR-12 apresentaram infradesnívelamento do segmento ST com inversão da onda T no grupo SHR-12, sinais

eletrocardiográficos indicativos de isquemia cardíaca como resultado, provavelmente, de alterações cardiovasculares induzidas pela hipertensão arterial.

Nossos resultados são corroborados por Angeli e colaboradores (2010), os quais afirmaram que anormalidades na repolarização ventricular são comuns em indivíduos hipertensos. A prevalência de sinais eletrocardiográficos indicativos de isquemia definidos como desnivelamento do segmento ST, inversão da onda T ou bloqueio completo de ramo esquerdo podem estar relacionados tanto com o aumento da idade quanto com a elevação da pressão arterial que, em médio ou longo prazo, pode promover a hipertrofia do ventrículo esquerdo, comprometendo a condução elétrica pelo coração e a hemodinâmica ventricular (Angeli et al, 2010). Tais parâmetros, bem como a análise detalhada do ECG, foram avaliados em outro artigo desta tese.

Os intervalos entre as ondas R (R-R) do ECG foram utilizados para a determinação da Variabilidade da Frequência Cardíaca.

A tabela 2 apresenta os valores dos índices de Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC), nos domínios do tempo e da frequência, dos grupos experimentais.

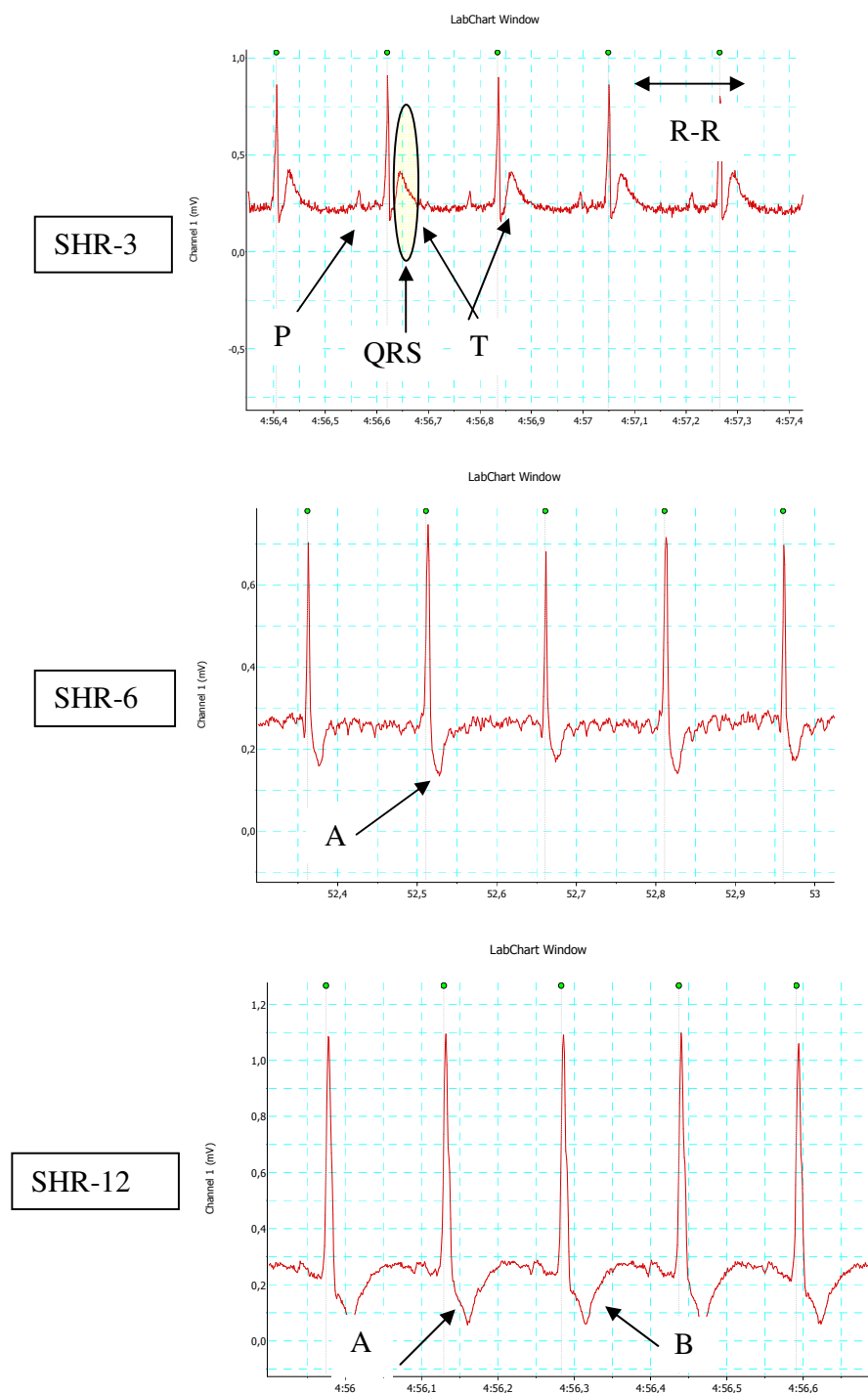


Figura 1. Segmentos dos eletrocardiogramas representativos dos grupos SHR-3, SHR-6 e SHR-12 em D₂. A onda P, o complexo QRS e a onda T apresentaram-se com registro normal no grupo SHR-3. Os grupos SHR-6 e SHR-12 apresentaram infradesnívelamento do segmento ST (A), sendo que no grupo SHR-12 a onda T apresentou-se invertida (B), sugerindo isquemia ventricular. Os intervalos entre as ondas R (R-R) foram utilizados para o cálculo da Variabilidade da Frequência Cardíaca.

Tabela 2. Valores dos índices autonômicos da Variabilidade da Frequência Cardíaca nos domínios do tempo e da frequência das fêmeas SHR com três (SHR-3), seis (SHR-6) e doze (SHR-12) meses de idade

índices	SHR-3	SHR-6	SHR-12
FC (bpm)	303,55 ± 31	373.78 ± 48 ^a	392,44 ± 36 ^b
SDNN (ms)	4,75 ± 1,13	6,77 ± 1,42	7,04 ± 1,04 ^b
RMSSD (ms)	6,08 ± 1,18	4,12 ± 0,91 ^a	3,73 ± 0,66 ^b
pNN50 (%)	20,57 ± 7,95	13,35 ± 3,97 ^a	12,03 ± 4,12 ^b
Total power (ms ²)	94,38 ± 15,23	79,28 ± 20,43	73,22 ± 12,06
LF power (ms ²)	3,94 ± 0,83	4,92 ± 0,21 ^a	6,15 ± 0,78 ^{b c}
HF power (ms ²)	4,02 ± 1,31	2,14 ± 0,44 ^a	1,19 ± 0,21 ^{b c}
LF/HF	0,89 ± 0,51	1,98 ± 0,57 ^a	3,81 ± 0,66 ^{b c}

Dados expressos como média ± SD. FC: frequência cardíaca; SDNN: desvio padrão da media dos intervalos R-R; RMSSD: raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos R-R consecutivos; pNN50: porcentagem de intervalos R-R que variaram mais que 50 ms do intervalo anterior; Total power:: variação do intervalo R-R em baixa e alta frequência; LF: faixa de baixa frequência (0,2-0,75 Hz); HF: faixa de alta frequência (0,75-3,0 Hz) ; LF/HF: equilíbrio da ação autonômica sobre o intervalo R-R; p < 0,05 em relação: (^a) SHR-3xSHR-6; (^b) SHR-3xSHR-12 and (^c) SHR-6xSHR12; n = 5.

Nossos resultados evidenciaram significativas alterações na VFC nos grupos SHR-6 e SHR-12, em relação ao SHR-3, devido, provavelmente, aos maiores valores de pressão arterial encontrados nesses animais.

As diferenças na variabilidade da frequência cardíaca entre os grupos hipertensos (SHR-6 e SHR-12), em relação ao grupo normotenso (SHR-3), estão de acordo com relatos prévios, no que diz respeito a alterações da SDNN (Barbosa et al, 2002), PNN50

(Chakko et al, 1993), LF (Chakko et al, 1993; Huikuri et al, 1996; Singh et al, 1998), HF e LH/HF (Pikkujamsa et al, 1998; Sevre et al, 2001; Menezes-Jr et al, 2004).

Apesar dos menores valores absolutos observados em ratas com 6 e 12 meses para o índice *Total Power*, o fato de não serem significativos não permitiu que afirmássemos a existência de alterações na participação do sistema nervoso autônomo como um todo sobre a atividade cardíaca. Entretanto, o aumento do índice SDNN nos grupos SHR-6 (não significativo) e SHR-12, sugere aumento da atividade de uma das divisões autonômicas nesses animais, em relação ao grupo SHR-3. Esse índice não permite distinguir se as alterações da VFC foram devidas ao aumento do tônus simpático e/ou à redução do tônus parassimpático.

O aumento da frequência cardíaca, verificado nos grupos de fêmeas SHR-6 e SHR-12, sugere predominância da função autonômica simpática e/ou redução da atividade parassimpática, em relação ao grupo SHR-3,

De fato, observamos redução significativa nos índices RMSSD, PNN50 e HF nos grupos SHR-6 e SHR-12, em relação ao SHR-3, refletindo menor modulação parassimpática sobre o coração desses animais. Realmente, segundo Menezes Jr. et al (2004), a queda na atividade parassimpática está refletida nos baixos valores do PNN50 observados em pacientes com hipertensão moderada, uma vez que o valor deste índice no domínio do tempo é consequência, principalmente, do tônus vagal.

Além disso, os grupos SHR-6 e SHR-12 apresentaram aumento significativo da VFC, tendo como parâmetro a variação do intervalo R-R na faixa de baixa frequência (LF), refletindo maior atividade simpática nesses grupos, em relação ao grupo SHR-3.

O aumento significativo da relação LF/HF nos grupos SHR-6 e SHR-12 evidenciou maior atividade autonômica sobre o coração, com predominância do tônus simpático associada à redução da modulação parassimpática nesses grupos, em relação ao grupo SHR-3.

O fato de termos trabalhado com ratas SHR de 3 e 6 meses (as quais ainda estavam ciclando), os níveis de estrógenos presentes podem ter contribuído para a predominância da atividade simpática durante o período pré-menopausa dos grupos estudados. Nossos resultados estão de acordo com Dias e colaboradores (2010), os quais verificaram que a ovariectomia não afetou o balanço simpátovagal em animais SHR, porém a administração de estradiol aumentou a modulação simpática nesse modelo experimental.

Segundo Menezes Jr. E colaboradores (2004), o tratamento de pacientes com anti-hipertensivos do tipo inibidores da enzima conversora de angiotensina, proporcionou significativa recuperação de todos os índices de variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos hipertensos. A recuperação do tônus parassimpático, antes diminuído nos pacientes hipertensos, mostrou que a angiotensina II é um potente inibidor da atividade barorreflexa arterial (Bigger et al, 1992). Dessa forma, a ação dos baroreceptores arteriais envolve principalmente redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal.

Convém destacar, como visto anteriormente, a participação do sistema-renina-angiotensina no desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo experimental de animais SHR. Assim, apesar de não fazer parte dos nossos objetivos, a participação do reflexo baroreceptor e a redução da atividade vagal associada, provavelmente, à ação da

angiotensina sobre o sistema cardiovascular, podem ter sido fatores determinantes na geração da hipertensão arterial deste modelo experimental.

8.5. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicaram que fêmeas SHR a partir de 6 meses apresentaram alterações significativas na variabilidade da frequência cardíaca, tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência, com predominância da ação simpática e redução da modulação parassimpática sobre a atividade cardíaca. Essas alterações foram conseqüentes à hipertensão arterial verificada a partir dos três meses, que se acentuou aos seis meses e permaneceu sustentada até os doze meses de idade. Essas variações na VFC constituem-se em índices preditores de risco cardíaco para ratas SHR, a partir dos três meses de idade.

8.6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Angeli F, Angeli, E, Cavallini, C, Ambrosio, G, Mazzotta, G. Reboldi, G, Verdecchia, P (2010). Electrocardiographic abnormalities of left ventricular repolarization: Prognostic implications in hypertensive post-menopausal women. *Maturitas* 67(2):159-65.
2. Aubert A E, Seps B, Beckers F (2003). Heart rate variability in athletes. *Sports Med.* 33(12): 889-919.
3. Barbosa F J, Barbosa P R B, Cordovil I (2002). Modulação autonômica do coração na hipertensão arterial sistêmica. *Arq. Bras. Cardiol.* 78: 181-188.
4. Bigger J T Jr, Fleiss J L, Steinmann R C, Rolnitzky L M, Kleiger R E, Rottman J N (1992). Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*, 85: 164-171.
5. Brunetto A F, Roseguini B T, Silva B M, Hirai D M, Guedes D P (2005). Limiar ventilatório e variabilidade de frequência cardíaca em adolescentes. *Rev. Bras. Med. Esporte*, 11(1):22-27.
6. Cambri L T, De-Oliveira F R, Gevaerd M S (2008). Variabilidade da frequência cardíaca e controle metabólico. *Arq. Sanny Pesq. Saúde*, 1(1): 72-82.
7. Caruana-Montaldo B, Gleeson K, Zwillich C W (2000). The control of breathing in clinical practice. *Chest*. 117(1): 205-25.
8. Chakko S, Mulingtapang R F, Huikuri H V, Kessler K M, Materson B J, Myerburg R J (1993). Alterations in heart rate variability and its circadian rhythm in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy free of coronary artery disease. *Am. Heart. J.* 126: 1364-1372.

9. Chatzimichali A, Zoumprouli A, Metaxari M, Apostolakis I, Daras T, Tzanakis N, Askitopoulou H (2011). Heart rate variability may identify patients who will develop severe bradycardia during spinal anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 55: 234-241.
10. Dias D P, Oliveira M, Salgado H C, Fazan R Jr (2010). Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (10): 969-75.
11. Di Iorio C, Cafiero T, Di Minno R M (2010). The effects of pneumoperitoneum and head-up position on heart rate variability and QT interval dispersion during laparoscopic cholecystectomy. *Minerva Anesthesiol.*, 76(11):882-889.
12. Fortepiani L A, Zhang H, Racusen L, Roberts L J, Reckelhoff J F (2003). Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 41: 640-645.
13. Huikuri H V, Yitalo A, Pikkujämsä S M (1996). Heart rate variability in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.*, 77: 1073-1077.
14. Kleiger R E, Miller J P, Bigger J T Jr, Moss A J (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, 59(4):256-62.
15. Landgraf S S, Wengert M, Silva J S, Zapata-Sudo G, Sudo R T, Takiya C M, Pinheiro A A, Caruso-Neves C (2010). Changes in angiotensin receptors expression play a pivotal role in the renal damage observed in spontaneous hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* [10.1152/ajprenal.00384.2010].

16. Lundin S, Ricksten S E, Thoren P (1984). Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol. Scand.*, 120: 265-272.
17. Malmberg B, Persson R, Flisberg P, Orbaek P (2010). Heart rate variability changes in physicians working on night call. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. Nov 25. [Epub ahead of print].
18. Menezes Júnior A S, Moreira H G, Daher M T (2004). Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina II. *Arq. Bras. Cardiol.* 83:165-168.
19. Pikkujamsa S M, Huikuri H V, Airaksinen K E (1998). Heart rate variability and baroreflex sensitivity in hypertensive subjects with and without metabolic features of insulin resistance syndrome. *Am. J. Hypertens.*, 11: 523-531.
20. Pumpila J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J (2002). Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *Int. J. Cardiol.* 84(1): 1-14.
21. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim C M, Suri J S (2006). Heart rate variability: a review. *Med. Bio. Eng. Comput.* 44(12): 1031-51.
22. Reckelhoff J F, Zhang H, Granger J P (1998). Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 31: 435-439.
23. Reed M J, Robertson C E, Addison P S (2005). Heart rate variability measurements and the prediction of ventricular arrhythmias. *Q J Med* 98: 87–95.

24. Rodríguez-Linares L, Méndez A J, Lado M J, Olivieri M J D, Vila X A, Gómez-Conde I (2010). An open source tool for heart rate variability spectral analysis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, in press.
25. Sevre K, Lefrandt J D, Nordby G (2001). Autonomic Function in hypertensive and normotensive subjects. The importance of gender. *Hypertension*, 37: 1351-1356.
26. Singh J P, Larson M G, Tsuji H, Evans J C, O'Donnell C J, Levy D (1998). Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham heart study. *Hypertension*, 32: 293-7.
27. Smith AL, Reynolds KJ, Owen H (2007). Correlated Poincaré indices for measuring heart rate variability. *Australas Phys. Eng. Sci. Med.*, 30(4): 336-341.
28. Sowmya R, Maruthy K N, Gupta R (2010). Cardiovascular autonomic responses to whole body isotonic exercise in normotensive healthy young adult males with parental history of hypertension. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 54(1): 37-44.
29. Stutzman S S, Brown C A, Hains S M, Godwin M, Smith G N, Parlow J L, Kisilevsky B S (2010). The effects of exercise conditioning in normal and overweight pregnant women on blood pressure and heart rate variability. *Biol. Res. Nurs.*, (2): 137-48.
30. Tadepalli A S, Walsh, G M Tobia A J (1974). Normal cardiac output in the conscious young spontaneously hypertensive rat: Evidence for higher oxygen utilization. *Life Sciences*, 15(6): 1103-1114.
31. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). Heart rate variability: standards

- of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 93(5):1043-65.
32. Tulppo M P, Mäkikallio T H, Seppänen T, Laukkanen R T, Huikuri H V (1998). Vagal modulation of heart rate during exercise: effects of age and physical fitness. *Am. J. Physiol.* 274: H424-H429.
 33. Twomey N, Walsh N, Doyle O, McGinley B, Glavin M, Jones E, Marnane W P (2010). The effect of lossy ECG compression on QRS and HRV feature extraction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 1: 634-637.
 34. Vanderlei L C M, Pastre C M, Hoshi R A, Carvalho T D, Godoy M F (2009). Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 24(2): 205-217.
 35. Vanderlei L C M, Pastre C M, Freitas I F Jr, Godoy M F (2010). Geometric indexes of heart rate variability in obese and eutrophic children. *Arq. Bras. Cardiol.* 95(1): 35-40.
 36. Wolf H K, Gregor R D, Chandler B M (1977). Use of computers in clinical electrocardiography: an evaluation. *Can. Med. Assoc. J.*, 117(8): 877-880.
 37. Yamori Y (1984). The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: *Handbook of Hypertension. Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension* (de Jong W, ed). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, pp 224-239.

9. Conclusões Gerais da Tese

A finalização desta Tese de Doutorado nos permitiu verificar algumas importantes alterações cardíacas a respeito do modelo SHR fêmeas jovens:

- ✓ Fêmeas SHR apresentam desde jovem adulta (três meses) elevação gradual e progressiva da pressão arterial, bem como da pressão sistólica, pressão arterial média e pressão diastólica, como ocorrem em machos desta cepa;
- ✓ Tais efeitos da progressão da idade sobre a pressão arterial, também são observados no estudo eletrocardiográfico, o qual apresenta a partir dos 6 meses de idade, alterações significativas nas durações dos intervalos QRS, QT e QTc. O tempo de duração da ejeção, da não-ejeção e do ciclo completo também aumentou, refletindo a demora na condução do impulso por toda a massa cardíaca;
- ✓ A partir dos 12 meses de idade observou-se, também, alterações na morfologia do traçado do ECG, com a superposição de duas ondas R, conhecido como entalhe, característico de uma dificuldade na condução do impulso elétrico pelo septo ventricular e, conseqüentemente, da despolarização em tempos diferentes dos dois ventrículos, direito e esquerdo. E, também, supradesnívelamento do segmento ST e inversão da onda T, característico de isquemia cardíaca, resultados inéditos para este modelo;
- ✓ Nos parâmetros hemodinâmicos ventriculares, observa-se o aumento da força de contração (inotropismo positivo) a partir do aumento da dp/dt máxima e do índice de contração (IC) devido a hipertrofia ventricular esquerda observada pelo aumento da área dos cardiomiócitos, a partir dos 6 meses de idade;
- ✓ Esse aumento da massa cardíaca, com o passar do tempo, torna-se prejudicial, pois, diminui a complacência ventricular, prejudicando a atividade lusitrópica.
- ✓ Os dados da Variabilidade da Frequência Cardíaca indicaram que, a partir dos seis meses de idade, os animais SHR apresentaram maior atividade

autônômica sobre o coração, com predominância do tônus simpático associada à redução da modulação parassimpática, tornando esses animais sujeitos às arritmias cardíacas descritas anteriormente.

Concluindo, as alterações cardíacas observadas em fêmeas SHR no período pré-menopausa foram devidas à progressão da hipertensão arterial sustentada, a qual refletiu no aumento da atividade autonômica simpática e redução da modulação parassimpática sobre a atividade cardíaca desse modelo experimental, independentes da ação estrogênica.

10. Referências Bibliográficas Gerais

1. Amenta F, Tayebati S K, Tomassoni D (2010). Spontaneously Hypertensive Rat neuroanatomy: applications to pharmacology research. **Ital. J. Anat. Embryol.** 115: 13-17.
2. Angeli F, Angeli, E, Cavallini, C, Ambrosio, G, Mazzotta, G, Reboldi, G, Verdecchia, P (2010). Electrocardiographic abnormalities of left ventricular repolarization: Prognostic implications in hypertensive post-menopausal women. **Maturitas** 67(2):159-65.
3. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick E H, Olivetti G, Meggs L G, Capasso J M (1990). Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. **Circ. Res.**, 67: 871-885.
4. Asai K, Kudej R K, Shen Y T (2000). Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 20: 1493–1499.
5. Aubert A E, Seps B, Beckers F (2003). Heart rate variability in athletes. **Sports Med.** 33(12): 889-919.
6. August P, Oparil S (1999). Hypertension in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 84: 1862-1866.
7. Barbosa F J, Barbosa P R B, Cordovil I (2002). Modulação autonômica do coração na hipertensão arterial sistêmica. **Arq. Bras. Cardiol.** 78: 181-188.
8. Bauml M A, Underwood D A (2010). Left ventricular hypertrophy: An overlooked cardiovascular risk factor. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 77: 381-387.

9. Berenji K, Drazner M H, Rothermel B A, Hill J A (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 289: H8–H16.
10. Besse S, Delcayre C, Chevalier B, Hardouin S, Heymes C, Bourgeois F, Moalic J M, Swynghedaw B (1994). Is the senescent heart overloaded and already failing? A review. **Cardiovasc. Drugs Ther.** 8: 581–587.
11. Bigger J T Jr, Fleiss J L, Steinmann R C, Rolnitzky L M, Kleiger R E, Rottman J N (1992). Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. **Circulation**, 85: 164-171.
12. Burl V L, Welton P, Roccella E J, Brown C, Cutler J A, Higgins M, Horan M J, Labarthe D (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension**, 25; 305-313.
13. Brunetto A F, Roseguini B T, Silva B M, Hirai D M, Guedes D P (2005). Limiar ventilatório e variabilidade de frequência cardíaca em adolescentes. **Rev. Bras. Med. Esporte**, 11(1):22-27.
14. Cambri L T, De-Oliveira F R, Gevaerd M S (2008). Variabilidade da frequência cardíaca e controle metabólico. **Arq. Sanny Pesq. Saúde**, 1(1): 72-82.
15. Caruana-Montaldo B, Gleeson K, Zwillich C W (2000). The control of breathing in clinical practice. **Chest**. 117(1): 205-25.
16. Cernadas M R, Demiguel L S, Garcia D M (1998). Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. **Circ. Res.**, 83: 279–286.

17. Chakko S, Mulingtapang R F, Huikuri H V, Kessler K M, Materson B J, Myerburg R J (1993). Alterations in heart rate variability and its circadian rhythm in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy free of coronary artery disease. **Am. Heart. J.** 126: 1364-1372.
18. Challah M, Nadaud S, Philippe M (1997). Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. **Am. J. Physiol.**, 42: H1941–1948.
19. Chatzimichali A, Zoumprouli A, Metaxari M, Apostolakis I, Daras T, Tzanakis N, Askitopoulou H (2011). Heart rate variability may identify patients who will develop severe bradycardia during spinal anaesthesia. **Acta Anaesthesiol Scand.** 55: 234-241.
20. Cohn, J. N (1995). Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. **Clin. Cardiol.** 18 (Suppl. IV): IV4–IV12.
21. Dempsey J A, Veasey S C, Morgan B J, O'Donnell C P (2010). Pathophysiology of Sleep Apnea. **Physiol. Rev.**, 90(1): 47-112.
22. De Wardener H E and MacGregor G A (2002). Sodium and blood pressure. **Curr. Opin. Cardiol.**, 17: 360–367.
23. Dias D P, Oliveira M, Salgado H C, Fazan R Jr (2010). Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Braz. J. Med. Biol. Res.** (10): 969-75.
24. Dice J F (1993). Cellular and molecular Mechanisms of aging. **Physiological Reviews**, 73: 149-159.

25. Diederik Boon, Jeroen van Goudoever, Jan J. Piek, Gert A. van Montfrans (2003). ST Segment Depression Criteria and the Prevalence of Silent Cardiac Ischemia in Hypertensives. **Hypertension**. 41: 476-481.
26. Di Iorio C, Cafiero T, Di Minno R M (2010). The effects of pneumoperitoneum and head-up position on heart rate variability and QT interval dispersion during laparoscopic cholecystectomy. **Minerva Anesthesiol.**, 76(11):882-889.
27. Enstron I, Lidfeldt J, Lindholm L H, Nerbrand C, Pennert K, Samsioe G (2002). Does blood pressure differ between users and non-users of hormone replacement therapy?: the Women's Health In the Lund Area (WHILA) Study. **Blood Press**, 11: 240-243.
28. Farhat M Y, lavigne M C, Ramwell P W (1996). The vascular protective effect of estrogen. **FASEB**, 10: 615-624.
29. Folkow B, Svanborg A (1993). Physiology of cardiovascular aging. **Physiological Reviews**, 73: 725-764.
30. Fortepiani L A, Zhang H, Racusen L, Jackson Roberts II L, Reckelhoff J F (2003). Characterization of an Animal Model of Postmenopausal Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, 41[part 2]:640-645.
31. Ganau A, Devereux R B, Roman M J, de Simone G, Pickering T G, Saba P S, Vargiu P, Simongini I, Laragh J H (1992). Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 19: 1550–1558.
32. Gates PE, Strain WD, Shore AC (2008). Human endothelial function and microvascular ageing. **Exp. Physiol.** 94: 311-316.

33. Gerhard M, Ganz P (1995). How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. **Circulation**, 92: 5-8.
34. Givertz MM, Andreou C, Conrad CH, Colucci WS (2007). Direct Myocardial Effects of Levosimendan in Humans With Left Ventricular Dysfunction. **Circulation**, 115:1218-1224.
35. Grimby G, Saltin B (1983). The ageing muscle. **Clin. Physiol. Oxf.**, 3: 209-218.
36. Grimes D A, Lobo R A (2002). Perspectives on the Women's Health Initiative trial of hormone replacement therapy. **Obstet. Gynecol.**, 100: 1344-1353.
37. Grimm D, Cameron D, Griesse DP, Riegger GA, Kromer EP (1998). Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. **Cardiovasc. Res.** 40: 297– 306.
38. Grodstein F, Stampfer M J, Manson J E, Colditz G A, Willet W C, Rosner B, Speizer F E, Hennekens C H (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. **N. Engl. J. Med.**, 335: 453-461.
39. Gross M L and Amann K (2004). Progression of renal disease: new insights into risk factors and pathomechanisms. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, 13: 307–312.
40. Guyton A C and Hall J E (2010). The Heart. **In: Textbook of Medical Physiology** (11th ed.), edited by Saunders. 103-114.
41. Hamilton C A, Brosnan M J, McIntyre M, Graham D, Dominiczak A F (2001). Superoxide excess in hypertension and aging. **Hypertension**, 37: 529–534.
42. Harman D (2001). Aging: overview. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 928: 1-21.

43. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer E P, Klovekorn W P, Schaper J (2003). Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. **Circulation**, 107: 984–991.
44. Henkens IR, Mouchaers KTB, Vliegen HW, van der Laarse WJ, Swenne CA, Maan AC, Draisma HHM, Schalij I, van der Wall EE, Schalij MJ, Vonk-Noordegraaf A (2007). Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 293: H1300–H1307.
45. Hinojosa-Laborde C, Lange D L, Haywood J R (2000). Role of female sex hormones in the development and reversal of Dahl hypertension. **Hypertension** 35: 484–489.
46. Huikuri H V, Yitalo A, Pikkujämsä S M (1996). Heart rate variability in systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.**, 77: 1073-1077.
47. Hyman D J and Pavlik V N (2003). Uncontrolled hypertension as a risk for coronary artery disease: patient characteristics and the role of physician intervention. **Curr. Atheroscler. Rep.** 5: 131–138.
48. Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim J, Wu X, Mulroney S, Sandberg K (2007). Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. **Gend. Med.**, 4: 56–71.
49. Ju M, Juichiro S, Satoshi M, Junichi A, Kazuo H (2007). Hypovolemia does not affect speed of isovolumic left ventricular contraction and relaxation in excised canine heart. **Shock** 29(3): 395-401.

50. Julius S and Nesbitt S (1996). Sympathetic overactivity in hypertension. A moving target. **Am. J. Hypertens.**, 9: 113S-120S.
51. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R (1996). Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fisher rats **Am J Physiol Heart Circ Physiol** (49): H1215-28.
52. Kleiger R E, Miller J P, Bigger J T Jr, Moss A J (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, 59(4):256-62.
53. Klöss S, Bouloumié A, Mülsch A (2000). Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. **Hypertension**, 35: 43–47.
54. Kovanen V, Suominen H (1989). Age- and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, 58: 765-771.
55. Kurtz T, Morris R (1987). Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. **J. Hypertens.** 10:127-31.
56. Landgraf S S, Wengert M, Silva J S, Zapata-Sudo G, Sudo R T, Takiya C M, Pinheiro A A, Caruso-Neves C (2010). Changes in angiotensin receptors expression play a pivotal role in the renal damage observed in spontaneous hypertensive rats. **Am J Physiol Renal Physiol.** 10.1152/ajprenal.00384.2010.
57. Levin E R (1995). Endothelins. **N. Engl. J. Med.**, 333: 356–363.

58. Levy D, Larson M G, Vasan R S, Kannel W B, Ho K K (1996). The progression from hypertension to congestive heart failure. **JAMA**, 275: 1557–1562.
59. Lip G Y H, Felmeden D C, Li-Saw-Hee F, Beevers D G (2000). Hypertensive heart disease: A complex syndrome or a hypertensive cardiomyopathy? **Eur. Heart J.**, 21: 1653-1665.
60. Lopez-Ruiz A, Sartori-Valinotti J, Yanes L L, Iliescu R, Reckelhoff J F (2008). Sex differences in control of blood pressure: role of oxidative stress in hypertension in females. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 295: H466–H474.
61. Lorell B H, Carabello B A (2000). Left Ventricular Hypertrophy Pathogenesis, Detection, and Prognosis. **Circulation**, 102:470-479.
62. Lundin S, Ricksten S E, Thoren P (1984). Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta Physiol. Scand.**, 120: 265-272.
63. Malmberg B, Persson R, Flisberg P, Orbaek P (2010). Heart rate variability changes in physicians working on night call. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**. Nov 25. [Epub ahead of print].
64. Malpas S C (2010). Sympathetic Nervous System Overactivity and Its Role in the Development of Cardiovascular Disease. **Physiol. Rev.**, 90 (2): 513-557.
65. Matz R L, Schott C, Stoclet J C, Andriantsitohaina R (2000). Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium- derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. **Physiol. Res.**, 49: 11–18.

66. McIntyre M, Hamilton C A, Rees D D, Reid J L, Dominiczak A F (1997). Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. **Hypertension**, 30: 1517-1524.
67. Menezes Júnior A S, Moreira H G, Daher M T (2004). Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina II. **Arq. Bras. Cardiol.** 83:165-168.
68. Miller A, Drummond G, Mast A, Schmidt H, Sobey C (2007). Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression and function in the cerebral circulation: role of estrogen. **Stroke** 38: 2142–2149.
69. Mills P J, Farag N H, Matthews S, Nelesen R A, Berry C C, Dimsdale J E (2003). Hormone replacement therapy does not affect 24-h ambulatory blood pressure in healthy non-smoking postmenopausal women. **Blood Press Monit.**, 8: 57-61.
70. Mullins L J, Bailey M A, Mullins J J (2006). Hypertension, Kidney, and Transgenics: A Fresh Perspective. **Physiol. Rev.** 86: 709–746.
71. Muscari C, Giaccari A, Giordano E, Clô C, Guarnieri C, Caldarera C M (1996). Role of reactive oxygen species in cardiovascular aging. **Mol. Cell Biochem.**, 160/161: 159–166.
72. Nakatani S, Garcia MJ, Firstenberg MS, Rodriguez L, Grimm RA, Greenberg NL, McCarthy PM, Vandervoort PM, Thomas JD (1999). Noninvasive Assessment of Left Atrial Maximum dP/dt by a Combination of Transmitral and Pulmonary Venous Flow. **J. Am. Col. Cardiol.** (34): 795-801.

73. Nawrot T, Den Hond E, Thijs L, Staessen J A (2003). Isolated systolic hypertension and the risk of vascular disease. **Curr. Hypertens. Rep.**, 5: 372–379.
74. Orlov S N, Mongin A A (2007). Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, 293: H2039–H2053.
75. Payne J A, Alexander B T, Khalil R A (2004). Decreased Endothelium-Dependent NO-cGMP vascular relaxation and hypertension in growth-restricted rats on a high-salt diet. **Hypertension**, 43: 420-427.
76. Pikkujamsa S M, Huikuri H V, Airaksinen K E (1998). Heart rate variability and baroreflex sensitivity in hypertensive subjects with and without metabolic features of insulin resistance syndrome. **Am. J. Hypertens.**, 11: 523-531.
77. Pinto Y, Paul M, Ganten D (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Cardiovasc. Res.**, 39: 77-88.
78. Pumpura J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J (2002). Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int. J. Cardiol.** 84(1): 1-14.
79. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim C M, Suri J S (2006). Heart rate variability: a review. **Med. Bio. Eng. Comput.** 44(12): 1031-51.
80. Reckelhoff J F, Zhang H, Granger J P (1998). Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 31: 435-439.

81. Reckenhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP (1999). Gender differences in hypertension in spontaneously rats: Role of androgens and androgen receptor. **Hypertension** 34: 920-923.
82. Reckelhoff JF, ZhangH, Srivastava K (2000). Gender differences in the development of hypertension in SHR: Role of the rennin-angiotensin system. **Hypertension** 35: 480-483.
83. Reckelhoff JF (2001). Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension** 37: 1199-1208.
84. Reckelhoff J F, Fortepiani L A (2004). Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, 43: 918-923.
85. Reed M J, Robertson C E, Addison P S (2005). Heart rate variability measurements and the prediction of ventricular arrhythmias. **Q. J. Med.** 98: 87-95.
86. Rees D D, Ben-Ishay D, Moncada S (1996). Nitric oxide and the regulation of blood pressure in hypertension-prone and hypertension-resistant Sabra rat. **Hypertension**, 28: 367-371.
87. Rodríguez-Linares L, Méndez A J, Lado M J, Olivieri M J D, Vila X A, Gómez-Conde I (2010). An open source tool for heart rate variability spectral analysis. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, in press.
88. Rosano G M, Sarrel P M, Poole-Wilson P A, Collins P (1993). Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. **Lancet**, 342: 133-136.

89. Schunkert H, Danser A H J, Hense H W, Derkc F H M, Kurzinger S, Riegger G A J (1997). Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. **Circulation**, 95: 39-45.
90. Sevre K, Lefrandt J D, Nordby G (2001). Autonomic Function in hypertensive and normotensive subjects. The importance of gender. **Hypertension**, 37: 1351-1356.
91. Sgarbossa EB, Pinski SL, Topol EJ, Califf RM, Barbagelata A, Goodman SG (1998). Acute myocardial infarction and complete bundle branch block at hospital admission: Clinical characteristics and outcome in the thrombolytic era. **J Am Coll Cardiol** 31: 105–110.
92. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005). Pre-eclampsia. **Lancet**, 365: 785–799.
93. Simon J A, Hsia J, Cauley J A, Richards C, Harris F, Fong J, Barret-Connor E, Hulley S B (2001). Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: the Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). **Circulation**, 103: 638-642.
94. Singh J P, Larson M G, Tsuji H, Evans J C, O'Donnell C J, Levy D (1998). Reduced heart rate variability and new-onset hypertension: insights into pathogenesis of hypertension: the Framingham heart study. **Hypertension**, 32: 293-7.
95. Slama M, Ahn J, Varagic J, Susic D, Frohlich E (2004). Long-term left ventricular echocardiographic follow-up of SHR and WKY rats: effects of hypertension and age. **Am J Physiol Heart Cic Physiol**. 286:H181-5.

96. Smith AL, Reynolds KJ, Owen H. Correlated Poincaré indices for measuring heart rate variability. **Australas Phys. Eng. Sci. Med.**, 30(4): 336-341.
97. Smulyan H, Safar M E (2000). The Diastolic Blood Pressure in Systolic Hypertension. **Ann. Intern. Med.**, 132:233-237.
98. Sowmya R, Maruthy K N, Gupta R (2010). Cardiovascular autonomic responses to whole body isotonic exercise in normotensive healthy young adult males with parental history of hypertension. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, 54(1): 37-44.
99. Stutzman S S, Brown C A, Hains S M, Godwin M, Smith G N, Parlow J L, Kisilevsky B S (2010). The effects of exercise conditioning in normal and overweight pregnant women on blood pressure and heart rate variability. **Biol. Res. Nurs.**, (2): 137-48.
100. Swynghedauw B (1999). Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. **Physiological Reviews**, 79(1):215-262.
101. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A (1993). Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. **Hypertension**, 21: 929-933.
102. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**, 93(5):1043-65.
103. Thompson J, Khalil R A (2003). Gender differences in the regulation of vascular tone. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 30: 1-15.

104. Tin LL, Beevers G, Lip GYH (2002). Hypertension, left ventricular hypertrophy and sudden death. **Current Cardiology Reports** 4: 449-457.
105. Tolbert T, Oparil S (2001). Cardiovascular effects of estrogen. **Am. J. Hypertens.**, 14 (6 Pt 2): 186S-193S.
106. Tulppo M P, Mäkikallio T H, Seppänen T, Laukkanen R T, Huikuri H V (1998). Vagal modulation of heart rate during exercise: effects of age and physical fitness. **Am. J. Physiol.** 274: H424-H429.
107. Twomey N, Walsh N, Doyle O, McGinley B, Glavin M, Jones E, Marnane W P (2010). The effect of lossy ECG compression on QRS and HRV feature extraction. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.**, 1: 634-637.
108. Vanderlei L C M, Pastre C M, Hoshi R A, Carvalho T D, Godoy M F (2009). Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** 24(2): 205-217.
109. Vanderlei L C M, Pastre C M, Freitas I F Jr, Godoy M F (2010). Geometric indexes of heart rate variability in obese and eutrophic children. **Arq. Bras. Cardiol.** 95(1): 35-40.
110. Vanhoutte P M (2002). Ageing and endothelial dysfunction. **European Heart Journal Supplements**, 4 (Supplement A): A8–A17.
111. Vlachopoulos C, Alexopoulos N, Stefanadis C (2010). Aortic Stiffness prime time for integration into clinical practice? **Hellenic J Cardiol.**, 51: 385-390.
112. Wei JY, Gersh BJ (1987). Heart disease in the elderly. **Curr Prob Cardiol** 12: 1-65.

113. Wimber N, Hoegholm A, Christenden H, Bang L, Mikkelsen K, Nielsen P, Svendsen T, Kampmann J, Madsen N, Bentzon M (1995). 24-h Ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subject, related to age and gender. **Am. J. Hypertension** 8: 978-986.
114. Wolf H K, Gregor R D, Chandler B M (1977). Use of computers in clinical electrocardiography: an evaluation. **Can. Med. Assoc. J.**, 117(8): 877-880.
115. Woolert KC, Drexler H (1995). The rennin-angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovasc. Res.**, 43: 838-849.
116. Wu Z, Maric C, Roesch D, Zheng W, Verbalis J, Sandberg K (2003). Estrogen regulates adrenal angiotensin AT1 receptors by modulating AT1 receptor translation. **Endocrinology** 144: 3251–3261.
117. Wynne F L, Payne J A, Cain A E, Reckelhoff J F, Khalil R A (2004). Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 43: 405-412.
118. Yamori Y (1984). Animal models for hypertension. **Nippon Rinsho**. 42: 258-270.
119. Yanes L L, Romero D G, Iliescu R, Zhang H, Davis D, J F (2010). Postmenopausal Hypertension: Role of the Renin-Angiotensin System. **Hypertension** 56: 359-363.

11. Anexos

DECLARAÇÃO

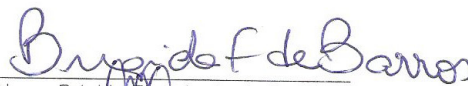
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada Alterações cardiovasculares de fêmeas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) relacionadas com a idade

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

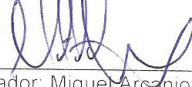
(☒) tem autorização da seguinte Comissão de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, sob Protocolo nº1652-2.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Brígida Figueiredo de Barros



Orientador: Miguel Arcanjo Areas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(☒) Deferido () Indeferido


Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEEA/UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

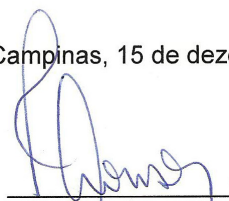
Certificamos que o Protocolo nº **1652-2**, sobre **"Efeito protetor de isoflavonas sobre o sistema cardiovascular de ratas SHR pós-menopausa"**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas / Brígida Figueiredo Barros**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em .

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1652-2**, entitled **"Protector effect of isoflavones on the cardiovascular system of menopause female SHR"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on .

Campinas, 15 de dezembro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Dear Dr. Brigida Figueiredo de Barros:

Thank you for submitting the manuscript, "BJMBR-882 - Age-Related changes in blood pressure, ventricular parameters and electrical cardiac activity in female spontaneously hypertensive rats" to Brazilian Journal of Medical and Biological Research. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/bjmbr/author/submission/43742>

Username: brigida-magal

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering our journal for publication of your paper.

Editors

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil

fax/phone: 55+16-3630-2778

phone: 55+16-3602-3173

E-mail: bjournal@fmrp.usp.br - bjournal@terra.com.br

On Line Version - <http://www.bjournal.com.br> - www.scielo.br/bjmbr

Arritmia cardíaca em fêmea de SHR com 12 meses de idade. Estudo de caso

Brígida Figueiredo de Barros e Miguel Arcanjo Áreas

Introdução: A arritmia cardíaca significa uma alteração do ritmo normal do coração, produzindo frequências cardíacas rápidas, lentas e/ou irregulares. Também é conhecida como disritmia ou ritmo cardíaco irregular. Arritmia cardíaca é causada por uma alteração na velocidade de transmissão ou no ritmo do impulso elétrico pelo coração. Essa alteração é mais comum em pessoas mais velhas e com problemas cardíacos, porém pode ocorrer em qualquer idade, independente do sexo e da etnia, estando ou não associadas a outras doenças do coração. De acordo com o local de origem as arritmias podem ser: a) Supraventriculares: originada nos átrios ou no nódulo atrioventricular; b) Ventriculares: originada nos ventrículos.

As arritmias dividem-se em dois tipos, de acordo com a frequência: a) Taquicardias: a frequência cardíaca é maior que 100 batimentos por minuto, para humano. Podem ser decorrentes de ansiedade, medicações ou exercício. A frequência cardíaca é considerada anormal quando ocorre um aumento súbito, desproporcional ao esforço realizado, podendo ocorrer em diversas circunstâncias (repouso, sono, atividades diárias ou exercício); b) Bradicardias: A frequência cardíaca é menor que 60 batimentos por minuto para humano, podendo ser normal durante o repouso pelo uso de medicações ou em atletas.

Objetivo: Analisar as alterações que ocorrem no registro eletrocardiográfico em rata com 12 meses de idade, em relação a uma rata com 3 meses de idade.

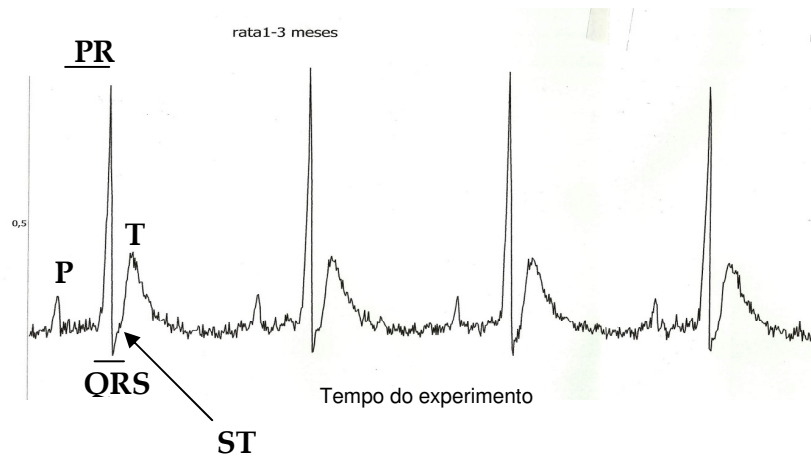


Figura 1: Registro de ECG de rata SHR com 3 meses de idade.

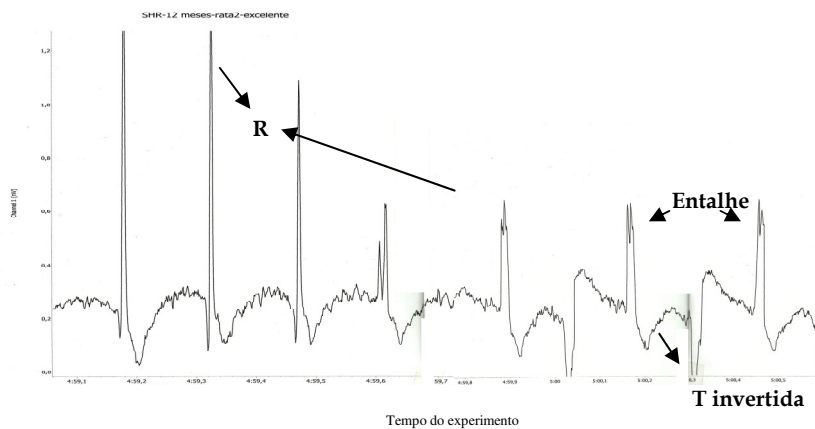


Figura 2: Registro de ECG de rata com 12 meses de idade.

Resultados: A figura 1 apresenta o perfil eletrocardiográfico de uma rata com 3 meses. É possível observar a representação de todas as ondas características: onda P positiva com amplitude normal seguida do intervalo PR regular. Presença do complexo QRS com duração e amplitude das suas respectivas ondas dentro da normalidade. Segmento ST com curta duração proporcional à frequência cardíaca da espécie estudada. Onda T presente e positiva.

A figura 2 apresenta redução na amplitude da onda P sendo, mascarada, em alguns momentos pelo ruído elétrico da linha de base do registro do ECG, indicando alteração no processo de despolarização atrial e, conseqüentemente, provável comprometimento do enchimento ativo ventricular. Presença de complexo QRS com ondas R de diferentes amplitudes sugerindo ativação irregular do ápice ventricular o que poderia repercutir em menor força contrátil. Além disso, nota-se a presença de “entalhe” em ondas R indicando ativação dos ventrículos direito e esquerdo em momentos diferentes caracterizando um bloqueio de ramo. A onda T apresenta-se invertida caracterizando provável processo isquêmico ventricular.

Conclusão: Tais alterações podem ser decorrentes do processo natural do envelhecimento, associado ou não, às alterações cardiovasculares induzidas pela hipertensão arterial, característica do modelo experimental SHR, independente da ação estrogênica, uma vez que as ratas entram no período da menopausa a partir do 12 meses de vida.