

Baroreflex deficit are associated with target organ damage

Janaina Paulini*

Abstract

As is well known, there are different pathophysiological conditions in which baroreflex deficit is enrolled in end-organ damage like hypertension, heart failure and myocardial infarction. The purpose of this study was to investigate the mechanisms enrolled in those relationships using a baroreflex deficit-induced model. Sinoaortic-denervated (SAD) rats were used as a model of arterial baroreflex impairment. Male Wistar rats were divided into: control (n = 9), and SAD (n = 8, 30 days) groups. SAD was performed using the method previously described by Krieger (1964). Cardiac morphology was assessed by echocardiography BP, HR and BP, and pulse interval (PI) variabilities were analyzed using a data acquisition system (Codas, 2kHz). Stroke volume and peripheral and regional resistance were evaluated using colored microspheres. SAD induced LV hypertrophy estimated by LV/BW mass using echocardiography. BP (C: 106±0.6 vs. SAD: 108±2 mmHg) and HR (C: 355±7 vs. SAD: 357±15 bpm) were not modified by SAD, while BP variability (C: 6.2±0.84 vs SAD: 14±0.9 mmHg) and PI variability (C: 24±0.7 vs SAD:17±0.8 ms) were increased and decreased, respectively. Moreover, a reduction was observed in stroke volume (C: 0.31±0.02 vs SAD: 0.25±0.01 mL/min) and an increase in total peripheral resistance (C: 0.97±0.07 vs. SAD: 1.23±0.07 mL/min/mmHg) in SAD animals. Those alterations resulted in increased cardiac vascular resistance (C: 35±1.6 vs. SAD:66±2.3 mmHg/mL/min/g) and renal vascular resistance (C: 31±1.2 vs. SAD: 75±2.2 mmHg/mL/min/g) in the SAD group. SAD induced an augment in cardiac and renal damage as cardiac morphology by histological techniques showed increased arterial wall and interstitial fibroses, and renal morphology showed interstitial fibroses and a decreased Bowmann space. Conclusion: Total baroreflex dysfunction impaired BP and HR variabilities associated with decreased stroke volume and increased peripheral and regional resistance. These adjustments may play an important role in target organ damage in different pathological conditions; even BP values were maintained at the control levels.

Keywords: Baroreflex. Renal Damage. Cardiac Damage.

INTRODUCTION

The arterial baroreceptor reflex system is one of the most important mechanisms for cardiovascular regulation, especially in maintaining the stability of blood pressure due to the rapidly acting mechanisms for controlling blood pressure and autonomic activity^{1,2}. When the reflex arc is interrupted by sinoaortic denervation (SAD), blood pressure variability and sympathetic activity are markedly increased without a sustained elevation of the blood pressure level^{3, 4, 5}. Recently, we have shown that obvious organ damage, including cardiac hypertrophy, vascular remodeling and renal lesions, exists in SAD rats^{6, 7, 8, 9}. However, little is known about the mechanisms underlying

SAD-induced organ damage.

The main function of the blood flow is transport. The circulatory system delivers oxygen and nutrients needed for metabolic processes to the tissues, carries waste products from cellular metabolism to the kidneys and other excretory organs for elimination, and circulates electrolytes and hormones needed to regulate body function¹⁰.

Therefore, the present work was designed to test the hypothesis that alterations in regional blood flow are involved in changes promoted by complete baroreflex dysfunction (surgically induced by sinoaortic denervation) leading to target organ damage.

DOI: 10.15343/0104-7809.201740A433446

*Experimental Hypertension Laboratory, Hypertension Unit, Heart Institute, University of Sao Paulo Medical School. São Paulo/SP, Brazil.

E-mail: janapaulini@gmail.com

METHODS

Animals

Groups of adult male Wistar rats (200–300 g) were housed singly in plastic cages with controlled temperatures (20–24°C) and with 12-h light/dark cycle and rat feed ad libitum. All procedures were performed in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (U.S. National Institute of Health, NIH Pu) and the local ethical committee for animal research approved the protocol. The rats were randomly distributed into two groups: control (C), n=10 and sinoaortic denervation (SAD), n=9. SAD was performed under pentobarbital anesthesia (50mg/kg, i.p.). A 3-cm midline incision was made, and sternocleidomastoid muscles were reflected laterally, exposing the neurovascular sheath. The common carotid arteries and the vagal trunk were isolated, and the aortic depressor fibers either traveling with the sympathetic nerve or as an isolated aortic nerve were cut. The communicating branch of the aortic fibers was also resected. The third contingent of aortic baroreceptor fibers traveling with the inferior laryngeal nerve was interrupted by resection of the superior laryngeal nerve after the carotid bifurcation was exposed extensively for carotid stripping. To complete SAD, the sinus nerve as well as all carotid branches and the carotid body were resected¹¹.

Non-invasive Evaluations of cardiac morphology

The transthoracic echocardiography was performed at the end of protocol using a SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA, USA). The echocardiography indexes were obtained according to the recommendations of the American Society of Echocardiography. Images were obtained in anesthetized rats (Ketamine 80 mg/Kg and Xylazine 12 mg/Kg, i.p.) with a transducer on each animal's shaved chest (lateral recumbence). All measurements were based on the average of 3 consecutive cardiac cycles. Wall thickness and LV dimensions were obtained from a short-axis view at the level of

the papillary muscles. LV mass was calculated by using the following formula, assuming a spherical LV geometry and was validated in rats: $LV\ mass = 1,047 \times [(LVd + PWDIA + IVSDIA)^3 - LVd^3]$, where 1,047 is the specific gravity of muscle, LVd is LV end-diastolic diameter, PWDIA is end-diastolic posterior wall thickness and IVSDIA is end-diastolic interventricular septum thickness. In addition, another index of morphology was evaluated, the relative wall thickness (RWT), which is expressed by $2 \times PWDIA / LVd$. It represents the relation between the LV cavity in diastole and the LV posterior wall¹².

Hemodynamics Measurements

Two catheters filled with 0.06 mL saline were implanted in anesthetized rats (50 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine) into the femoral artery and vein (PE-10) for direct measurements of AP and drug administration, respectively. Rats receiving food and water ad libitum were studied 1 day after catheter placement; the rats were conscious and allowed to move freely in the cage during the experiments. The arterial cannula was connected to a strain gauge transducer 6 (P23Db, Gould-Statham), and blood pressure signals were recorded over a 20-minute period by a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board (using a Dataq Instruments DI-720, 16-bit measurement resolution, 250kHz sampling rate). The software used for the acquisition was WINDAQ/PRO waveform recording software at 2000 Hz per channel. The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in mean (MAP), systolic (SAP) and diastolic arterial pressure (DAP) and heart rate (HR).

Pulse interval and blood pressure variability

Time-domain analysis consisted in calculating mean HR and systolic AP (SAP), PI variability (PIV), and SAP variability (SAPV) as the standard deviation from its respective time series.

The overall variability of the SAPV of the pulse interval was assessed in the frequency domain analysis by spectral estimation. The whole 20-min time series of SAP and PI were cubic-

spline-interpolated (250 Hz) and decimated to be equally spaced in time. Following linear trend removal, power spectral density was obtained by the Fast Fourier Transformation using Welch's method over 16,384 points with a Hanning window and 50% overlapping. Spectral power for low-frequency (LF: 0.20–0.75 Hz) and high-frequency (HF 0.75–4.0 Hz) bands were calculated by power spectrum density integration within each frequency bandwidth, using a customized routine (MATLAB 6.0; Mathworks, Natick, MA)^{13,14}.

The autonomic balance (LF/HF) was calculated by the ratio of LF and HF absolute values.

Blood flow measurements

After arterial pressure measurements, yellow (150.000) 15-um Dye-Trak microspheres (Triton Technology, San Diego, CA, USA) were infused into blood flow measurements in heart, lungs, kidneys, muscle, and cardiac output (CO), and peripheral vascular resistance (PVR) determinations. Microsphere infusion and processing were performed as described previously¹⁵.

Tissue collection

One day after cardiovascular measurements, rats were divided into two groups. Animals were weighed and killed by decapitation. The heart was arrested in diastole by perfusion with a 0.9% NaCl plus 14 mM KCl solution (pressure equal to a 13-cm water column), followed by 4% tamponed formalin for tissue fixation. Briefly, hearts were excised, trimmed, weighed and immersed in 4% paraformaldehyde in PBS for 24h. Thereafter, the hearts and kidneys were processed and imbedded in paraffin to perform histologic sections. Histomorphometric analyses were performed by blinded observers. Sections of 3um were stained with hematoxylin-eosin for damage quantification. Analyses were performed using Quantimet (LEICA), a computerized image system.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SEM, and

ANOVA was used to compare groups, followed by the Student-Newman-Keuls test. The Pearson correlation was used to study the association between variables. The significance level was established as $p < 0.05$.

RESULTS

Body weight

Body weight was similar among all studied groups at the beginning of the protocol ($\sim 250 \pm 15$ g). At the end of the protocol, C and SAD groups increased body weight in comparison with their initial values (C: 341 ± 9 and SAD: 312 ± 6 g), however, the denervated group had a reduced body weight compared with the C group.

Hemodynamic Assessments

As shown in Table 1, SAD did not change SAP, DAP, and MAP values. However, SAD increased the systolic APV, as expressed by standard deviation and total variance. Baroreflex sensitivity, evaluated by bradycardic and tachycardic responses evoked by AP rises and falls, was, as expected, reduced in the SAD group. Both bradycardic and tachycardic responses were reduced in SAD groups.

Pulse Interval and blood pressure variability

The variability of SAP in the time domain was increased in denervated animals compared to the control group. (Table 1)

The results of PIV are markedly reduced in the SAD group when compared to the controls. LF and HF band of HRV were similar between groups. For that reason, the LF/HF ratio, an autonomic balance index, did not change. (Table 1)

Regional blood flow evaluation

Results of regional blood flow measurements are shown in Table 2. SAD induced a tissue perfusion reduction, as demonstrated by diminished blood flow to heart, lungs, kidneys, and muscles compared with the C group.

Stroke volume, regional and total peripheral resistance

Stroke volume was found to be markedly decreased in denervated animals. In addition, regional and peripheral resistances were increased in those animals (Table 3).

Cardiac Morphometry

SAD induced LV hypertrophy as indicated by LVW/BW increase (SAD: 2.42 ± 0.08 vs. C: 2.14 ± 0.02 mg/g). Moreover, the LV/BW estimated mass by echocardiography was increased in the SAD animals (SAD: 3.58 ± 0.12 vs. C: 3.42

± 0.06 mg/g). (Table 4) Echocardiographic evaluation showed that the posterior wall during diastole was higher in the SAD group than in the control group. SAD animals presented increased relative wall thickness as compared to the control ones. (Table 4)

Histology evaluations

Analyses of cardiac morphology by histological techniques showed that SAD rats presented increased arterial walls and interstitial fibroses (Figure 1). Renal morphology showed interstitial fibroses and a decreased Bowmann space (Figure 2).

Table 1 – Hemodynamic evaluations, pulse interval and blood pressure variability in control (C) and denervated (SAD) groups – 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

Measurement/Group	C	SAD
DAP (mmHg)	96 ± 2	92 ± 2
SAP (mmHg)	126 ± 2	123 ± 2
MAP (mmHg)	108 ± 2	106 ± 2
HR (bpm)	355 ± 7	357 ± 5
SAPV (mmHg ²)	29 ± 2	$46 \pm 7^*$
TR (bpm/mmHg)	3.0 ± 0.2	$0.40 \pm 0.07^*$
BR (bpm/mmHg)	1.51 ± 0.1	$0.12 \pm 0.1^*$
PIV (ms ²)	125 ± 18	$38 \pm 6^*$
LF (%)	32 ± 4	26 ± 4
HF (%)	69 ± 4	74 ± 4
LF/HF	0.41 ± 0.14	0.39 ± 0.10

Data are reported as means \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C.

Table 2 – Blood Flow measurements in control (C) and denervated (SAD) groups - 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

	Control	SAD
HEART	3.4 ± 0.2	$1.6 \pm 0.3^*$
LUNG	1.31 ± 0.11	$0.82 \pm 0.03^*$
KIDNEY	3.45 ± 0.2	$1.40 \pm 0.2^*$
GASTROCNÊMIO	0.25 ± 0.06	$0.10 \pm 0.02^*$
SÓLEO	1.5 ± 0.1	$0.84 \pm 0.2^*$

Data are reported as means \pm SEM. * $p < 0,05$ vs C.

Table 3 – Stroke volume, regional and total peripheral resistance in control (C) and denervated (SAD) groups - 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

	Control	SAD
PERIPHERAL	1.02 ± 0.05	1.27 ± 0.10*
HEART	35 ± 1.8	66 ± 2.6*
LUNG	82 ± 4	129 ± 10*
KIDNEY	31 ± 1.4	75 ± 5.4*
GASTROCNÊMIO	432 ± 20	1060 ± 38*
SÓLEO	72 ± 4	126 ± 6*
CARDIAC OUTPUT	111 ± 5.4	85 ± 5.1*

Data are reported as means ± SEM. *p<0,05 vs C.

Table 4 – Echocardiographic Parameters: LVDIA ventricular end-diastolic dimension, IVSDIA left ventricular end-systolic dimension, LVPWDIA left ventricular posterior wall thickness, RWT relative wall thickness, LV mass/BW, ratio of left ventricular mass to body weight in control and SAD groups - 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

	Control	SAD
LVDIA/BW (cm/g)	1.76 ± 0.02	1.68 ± 0.04
IVSDIA/BW (cm/g)	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02
LVPWDIA /BW (cm/g)	0.32 ± 0.01	0.39 ± 0.01*
RWT (cm)	0.33 ± 0.01	0.43 ± 0.02*
LV mass/BW (mg/g)	3.42 ± 0.06	3.58 ± 0.12*

Data are reported as means ± SEM. *p<0,05 vs C.

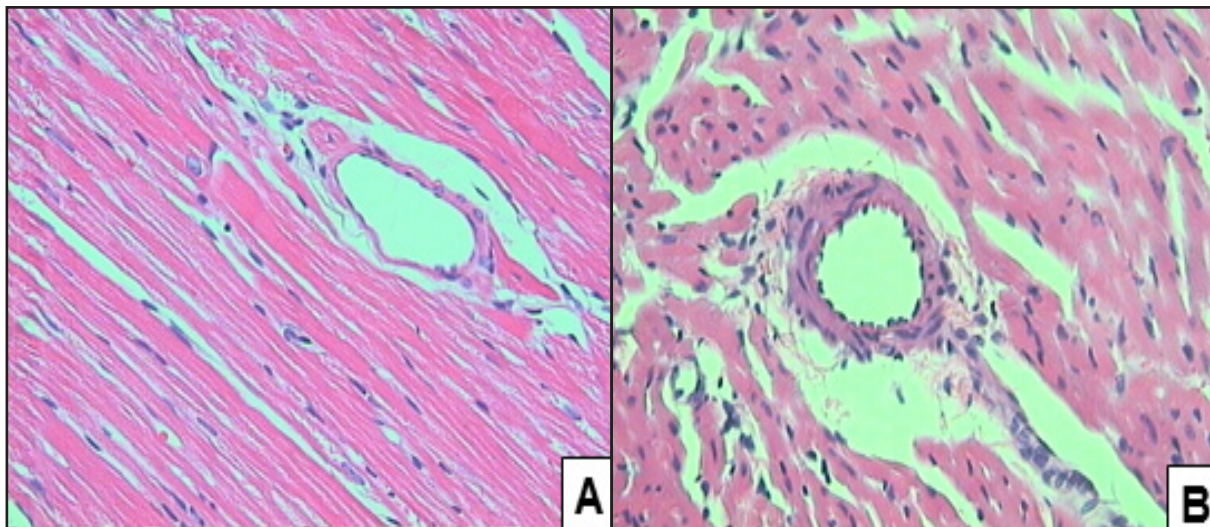


Figure 1 – Cardiac Histology of Control (A) and SAD (B) animals - 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

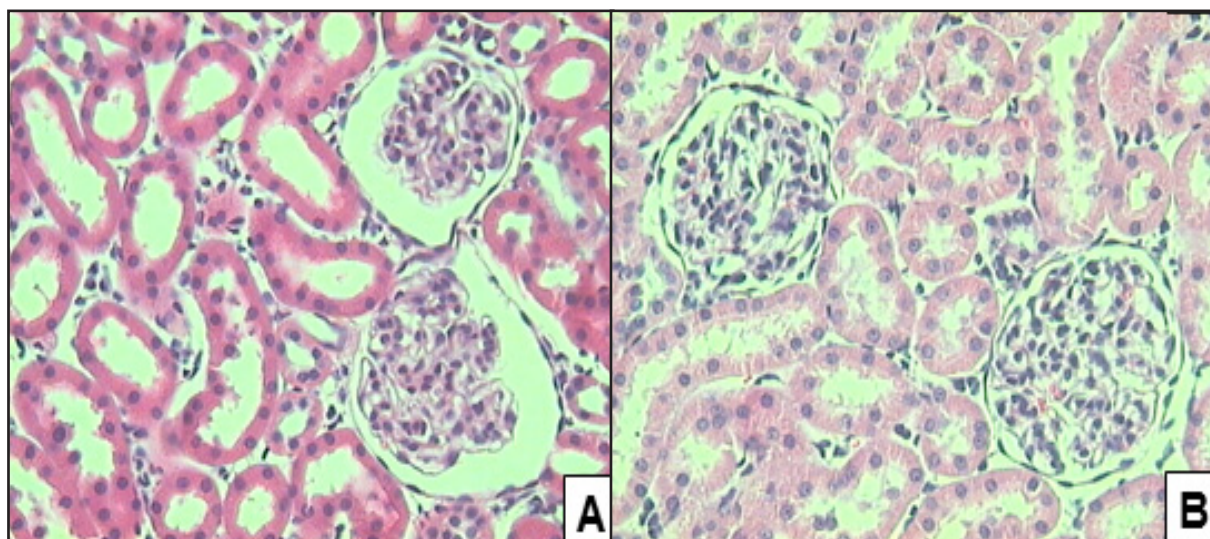


Figure 2 – Renal Histology of Control (A) and SAD (B) animals - 2011/ Heart Institute (Incor/SP-Brazil).

DISCUSSION

Several studies investigated the impact of baroreflex impairment on cardiovascular alterations¹⁶. Those studies reported that baroreflex impairment augments end-organ damage. However, it is not clear which mechanisms are related to these alterations and how an autonomic system would influence hemodynamic changes. In the present study, we investigated the effects of sinoaortic denervation on cardiac function, as well as blood flow and regional resistance alterations and their repercussion in target organ damage. As expected, baroreflex sensitivity was significantly decreased in the SAD rats, while SAP variability was enhanced.

Although increased tonic sympathetic activity has not been observed in chronic SAD25, the absence of the baroreflex inhibitory function over the sympathetic activity may contribute to phasic increased sympathetic responses under the SAD status.

In this study, we did not observe increased sympathetic modulation as expressed by LF component of HRV in denervated animals. It is important to highlight that this relative sympathetic predominance on the heart is probably due to a reduced HF component of HRV, representative of parasympathetic modulation. In fact, parasympathetic

impairment has been recognized as a marker of cardiovascular risk in different pathological conditions¹⁷.

It is well known that sinoaortic denervation increases BPV and that this is an important factor contributing to end organ damage¹⁸. Cardiac hypertrophy is a common feature of cardiovascular diseases. Clinical and experimental studies have demonstrated that high blood pressure is a major determinant of cardiac hypertrophy in hypertension; however, several other factors contribute to the remodeling process. In fact, a study from Miao et al. suggests that blood pressure variability is more important in the determination of end organ damage than blood pressure levels⁴.

On the other hand, SAD resulted in decreased regional blood flow and increased total and peripheral resistance. Those changes could be involved in the alterations observed in different tissues. This is an important finding since it can point out another important lesion mechanism associated with SAD.

Unpublished data from our laboratory indicated a reduction in cardiac output after SAD. Despite normal values of BP observed after SAD, all regional resistance was increased. The increased peripheral resistance associated with low cardiac output could explain the

maintenance of BP values.

Moreover, this alteration leads to a cardiac hypertrophy and reduction in regional blood flow. In the kidney we showed an interstitial fibrosis suitable with renal injury. There is no

data in the literature regarding the mechanisms involved in target organ damage after SAD; our results prove that there is a strong relationship between baroreflex and damage outside the cardiovascular system.

CONCLUSION

In conclusion, we provided evidence for the important role of baroreflex in cardiac functional and hemodynamic parameters. The absence of baroreflex, which determined the loss of sympathetic activity control and the increase of the blood pressure variability, resulted in

increased regional and peripheral resistance and decreased stroke volume. These adjustments may be implicated in the physiopathology of the organ-damage in different pathological conditions, independently of the average BP levels.

REFERENCES

1. Su DF, Chen L, Kong XB, Cheng Y. Determination of arterial baroreflex- blood pressure control in conscious rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:103-109.
2. Van Vliet BN, Montani JP. Baroreflex stabilization of the double product. *Am J Physiol* 1999; 277:H1679-1689.
3. Norman RG Jr, Coleman TG, Dent AC. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension* 1981; 3:119-125.
4. Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *Hypertension*. Jun 24, 2006; 6:1125-1135.
5. Buchholtz RA, Nathan NA. Chronic lability of the arterial pressure produced by electrolytic lesions of the nucleus tractus solitarii in the rat. *Circ Res* 1984; 54:227-238.
6. Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension. *J Hypertens* 1987; 5:93-98.
7. La Rovere, MT., Bigger JR, JT., Marcus FL., Mortara A., Schwartz, PJ., Baroreflex Sensitivity and Heart-Rate Variability in Prediction of Total Cardiac Mortality After Myocardial Infarction, *The Lancet*, v. 351, 1998, 478-484.
8. Schaan BD, Dall'Ago P, Maeda CY, Ferlin E, Fernandes TG, Schmid H, Irigoyen MC. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(12):1895-902.
9. Shan ZZ, Dai SM, Su DF. Arterial baroreflex deficit induced organ damage in sinoaortic denervated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 427-437.
10. Porth, Carol. *Essentials Of Pathophysiology : Concepts of Altered Health States*. Philadelphia :Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
11. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*. 1995;6:1111-1116.
12. Wichi R, Malfitano C, Rosa K, ET al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol*. Apr 26, 2007; 6:14.
13. Malliani A, Montano N. Heart rate variability as a clinical tool. *Ital Heart J*. Aug 3, 2002;8:439-445.
14. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*. 1995;6:1111-1116.
15. De Angelis K, Gama VM, Farah VA, Irigoyen MC. Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jan;38(1):119-25. Epub 2005 Jan 18.
16. Miao CY, Su DF. The importance of blood pressure variability in rat aortic and left ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation. *J Hypertens*. Sep 20, 2002; 9:1865-1872.
17. Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep 28, 2001; 9:709-715.
18. Krieger, E.M. Neurogenic Hypertension in the rat. *Circ Res*. v.15, p. 511- 21, 1964.

Os déficits de barorreflexo estão associados ao dano do órgão alvo

Janaina Paulini*

Resumo

Existem diferentes condições fisiopatológicas em que o déficit de barorreflexo está associado ao dano do órgão final, como hipertensão, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio. O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos inscritos nestes relacionamentos usando um modelo induzido por déficit de barorreflexo. Foram utilizados ratos com desnervação sino-aórtica (SAD) como modelo de comprometimento barorreflexo arterial. Os ratos Wistar machos foram divididos em grupos controle (n = 9) e SAD (n = 8, 30 dias). O SAD foi realizado utilizando o método anteriormente descrito por Krieger (1964). A morfologia cardíaca foi avaliada pela ecocardiografia PA, e as variabilidades de FC e PA, e do intervalo de pulso (IP) foram analisadas usando um sistema de aquisição de dados (Codal, 2kHz). O volume sistólico e a resistência periférica e regional foram avaliados utilizando microesferas coloridas. SAD induziu hipertrofia do VE estimada pela massa de VE/PC usando ecocardiografia. PA (C: 106±0,6 vs. SAD: 108±2 mmHg) e FC (C: 355±7 vs. SAD: 357±15 bpm) não foram modificados pelo SAD, enquanto a variabilidade da PA (C: 6,2±0,84 vs. SAD: 14±0,9 mmHg) e a variabilidade de PI (C: 24±0,7 vs. SAD: 17±0,8 ms) aumentaram e diminuíram, respectivamente. Além disso, observou-se uma redução no volume sistólico (C: 0,31±0,02 vs. SAD: 0,25 ± 0,01 mL/min) e um aumento na resistência periférica total (C: 0,97±0,07 vs. SAD: 1,23±0,07 mL/min/mmHg) em animais SAD. Essas alterações resultaram em aumento da resistência vascular cardíaca (C: 35±1,6 vs. SAD: 66 ± 2,3 mmHg/mL/min/g) e resistência vascular renal (C: 31±1,2 vs. SAD: 75±2,2 mmHg/mL/min/g) no grupo SAD. SAD induziu um aumento no dano cardíaco e renal como a morfologia cardíaca por técnicas histológicas mostrou aumento da parede arterial e fibrose intersticial, e a morfologia renal mostrou fibrose intersticial e uma diminuição do espaço de Bowmann. A disfunção barorreflexa total prejudicou as variabilidades de PA e FC associadas à diminuição do volume sistólico e ao aumento da resistência periférica e regional. Esses ajustes podem desempenhar um papel importante no dano de órgãos alvo em diferentes condições patológicas; até mesmo os valores da PA foram mantidos nos níveis de controle.

Palavras-chave: Baroreflex. Dano renal. Dano cardíaco.

INTRODUÇÃO

O sistema reflexo do barorreceptor arterial é um dos mecanismos mais importantes para a regulação cardiovascular, especialmente na manutenção da estabilidade da pressão arterial devido aos mecanismos de atuação rápida para controlar a pressão arterial e a atividade autonômica^{1,2}.

Quando o arco reflexo é interrompido pela desnervação sino-aórtica (SAD), a variabilidade da pressão arterial e a atividade simpática são marcadamente aumentadas sem uma elevação sustentada do nível de pressão arterial^{3,4,5}. Recentemente, mostramos que os danos óbvios dos órgãos, incluindo hipertrofia cardíaca, remodelação vascular e lesões renais, existem em ratos SAD^{6,7,8,9}.

Contudo, pouco é conhecido sobre os

mecanismos subjacentes aos danos aos órgãos induzidos por SAD.

A principal função do fluxo sanguíneo é o transporte. O sistema circulatório fornece oxigênio e nutrientes necessários para os processos metabólicos nos tecidos, transporta resíduos do metabolismo celular para os rins e outros órgãos excretadores para eliminação, e circula eletrólitos e hormônios necessários para regular a função corporal¹⁰.

Portanto, o presente trabalho foi projetado para testar a hipótese de que as alterações no fluxo sanguíneo regional estão envolvidas em mudanças promovidas por disfunção barorreflexa completa (induzida cirurgicamente pela desnervação sino-aórtica) levando ao dano de órgão alvo.

MÉTODOS

Animais

Grupos de ratos Wistar machos adultos (200-300 g) foram alojados individualmente em gaiolas de plástico com temperaturas controladas (20-24° C) e com ciclo luz/obscuridade de 12 h e alimentação para rato *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” (Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NIH Pu) e o comitê de ética local para pesquisa animal aprovou o protocolo. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: controle (C), n=10 e desnervação sino-aórtica (SAD), n=9. O SAD foi realizado sob anestesia com pentobarbital (50mg/kg, i.p.). Foi feita uma incisão na linha média de 3 cm, e os músculos esternocleidomastoideos foram refletidos lateralmente, expondo a bainha neurovascular. As artérias carótidas comuns e o tronco vagal foram isolados e as fibras depressoras aórticas que viajam com o nervo simpático ou como um nervo aórtico isolado foram cortadas. O ramo de comunicação das fibras aórticas também foi ressecado. O terceiro contingente de fibras barorreceptoras aórticas que viajam com o nervo laríngeo inferior foram interrompidas pela ressecção do nervo laríngeo superior após a exposição à bifurcação carotídea extensivamente para a remoção carotídea. Para completar SAD, o nervo sinusal, bem como todos os ramos carotídeos e o corpo carotídeo foram ressecados¹¹.

Avaliações não-invasivas de morfologia cardíaca

O ecocardiograma transtorácico foi realizado no final do protocolo usando SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA, EUA). Os índices de ecocardiografia foram obtidos de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia. As imagens foram obtidas em ratos anestesiados (Ketamine 80 mg/Kg e Xylazin 12 mg/Kg, i.p.) com um transdutor no peito raspado de cada animal (decúbito lateral).

Todas as medidas foram baseadas na média de 3 ciclos cardíacos consecutivos. A espessura da parede e as dimensões do VE foram obtidas a partir de uma visão de eixo curto ao nível dos músculos papilares. A massa de VE foi calculada usando a seguinte fórmula, assumindo uma geometria esférica do VE e foi validada em ratos: massa de VE = $1,047 \times [(VEd + DIAEPP + ESIDIA)^3 - VEd^3]$, onde 1.047 é a gravidade específica do músculo, VEd é diâmetro diastólico final do VE, DIAEPP é a espessura da parede posterior diastólica e ESIDIA é a espessura do septo interventricular diastólico final. Além disso, avaliou-se outro índice de morfologia, a espessura relativa da parede (ERP), que é expressa por $2 \times EPPDIA / VEd$. Representa a relação entre a cavidade do VE na diástole e a parede posterior do VE¹².

Medições Hemodinâmicas

Dois cateteres preenchidos com 0,06 mL de solução salina foram implantados em ratos anestesiados (50 mg/kg de Ketamina e 10 mg/kg de Xilazina) na artéria e veia femoral (PE-10) para medições diretas de PA e administração de fármaco, respectivamente. Os ratos que receberam alimentos e água *ad libitum* foram estudados 1 dia após a colocação do cateter; os ratos estavam conscientes e podiam se mover livremente na gaiola durante os experimentos. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de *strain gauge*6 (P23Db, Gould-Statham) e os sinais de pressão arterial foram registrados em um período de 20 minutos por um microcomputador equipado com um conversor analógico-digital (usando um Dataq Instruments DI -720, resolução de medição de 16 bits, taxa de amostragem de 250 kHz). O software utilizado para a aquisição foi o software de gravação de formas WINDAQ/PRO a 2000 Hz por canal. Os dados gravados foram analisados em uma base de batida-por-batida para quantificar mudanças na pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), e frequência cardíaca (FC).

Intervalo de pulso e variabilidade da pressão artéria

A análise do domínio do tempo consistiu

no cálculo da FC e PA sistólica (SAP) média, variabilidade IP (VIP) e variabilidade PAS (VPAS) como o desvio padrão de suas respectivas séries temporais. A variabilidade geral do VPAS do intervalo de pulso foi avaliada na análise de domínio de frequência por estimativa espectral. Todas as séries de tempo de 20 minutos de PAS e IP foram interpoladas por spline cúbicas (250 Hz) e dizimadas para serem igualmente espaçadas no tempo.

Após a remoção da tendência linear, a densidade espectral de potência foi obtida pela Transformação de Fourier Rápida usando o método de Welch em 16.384 pontos com uma janela de Hanning e sobreposição de 50%. O poder espectral para frequências de baixa frequência (BF: 0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF 0,75-4,0 Hz) foram calculados por integração de densidade de espectro de potência dentro de cada largura de banda de frequência, utilizando uma rotina personalizada (MATLAB 6.0; Mathworks, Natick, MA)^{13,14}.

O equilíbrio autonômico (BF / AF) foi calculado pela proporção de valores absolutos de BF e AF.

As medições de fluxo sanguíneo

Após medições de pressão arterial, as microesferas amarelas de Dye-Trak de 15 µm (150.000) (Triton Technology, San Diego, CA, EUA) foram infundidas nas medidas do fluxo sanguíneo no coração, nos pulmões, nos rins, nos músculos e no débito cardíaco (DC) e a determinação da resistência vascular periférica (RVP). A infusão e processamento das microesferas foram realizados conforme descrito anteriormente¹⁵.

Coleta de tecidos

Um dia após as medidas cardiovasculares, os ratos foram divididos em dois grupos. Os animais foram pesados e mortos por decapitação. O coração foi detido em diástole por perfusão com NaCl a 0,9% mais solução de KCl 14 mM (pressão igual a uma coluna de água de 13 cm), seguida por 4% de formalina tamponada para fixação tecidual. Resumidamente, os corações foram excisados, aparados, pesados e imersos em paraformaldeído (4%) em

PBS por 24h. Posteriormente, os corações e os rins foram processados e inseridos em parafina para realizar seções histológicas. As análises histomorfométricas foram realizadas por observadores cegos. Seções de 3 µm foram coradas com hematoxilina-eosina para quantificação de danos. As análises foram realizadas usando o Quantimet (LEICA), um sistema de imagem computadorizado.

Análise estatística

Os dados estão relatados como média ± SEM, e ANOVA foi usada para comparar os grupos, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls. A correlação de Pearson foi utilizada para estudar a associação entre as variáveis. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso corporal

O peso corporal foi semelhante entre todos os grupos estudados no início do protocolo (~250±15g). No final do protocolo, os grupos C e SAD aumentaram o peso corporal em comparação com os valores iniciais (C: 341±9 e SAD: 312±6 g), no entanto, o grupo desnervado teve um peso corporal reduzido em comparação com o grupo C.

Avaliações Hemodinâmicas

Conforme mostrado na Tabela 1, o SAD não alterou os valores PAS, PAD e PAM. No entanto, SAD aumentou a VPA sistólica, como expressado pelo desvio padrão e variância total. A sensibilidade ao barorreflexo, avaliada por respostas bradicárdicas e taquicárdicas evocadas por aumentos e quedas de PA, foi, conforme esperado, reduzida no grupo SAD. As respostas bradicárdicas e taquicárdicas foram reduzidas em grupos SAD.

Intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial

A variabilidade da PAS no domínio do tempo

foi aumentada em animais desnervados em comparação com o grupo controle. (Tabela 1)

Os resultados da VIP são marcadamente reduzidos no grupo SAD quando comparados aos controles. BF e AF bandas de VFC foram semelhantes entre os grupos. Por essa razão, a relação BF/AF, um índice de equilíbrio autônomo, não mudou. (Tabela 1)

Avaliação regional do fluxo sanguíneo

Os resultados das medidas regionais de fluxo sanguíneo são mostrados na Tabela 2. O SAD induziu redução da perfusão tecidual, como demonstrado pelo fluxo sanguíneo diminuído para o coração, pulmões, rins e músculos em comparação com o grupo C.

Tabela 1 – Avaliações hemodinâmicas, intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial em grupos controle (C) e desnervados (SAD) - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

Medição/Grupo	C	SAD
DAP (mmHg)	96 ± 2	92 ± 2
SAP (mmHg)	126 ± 2	123 ± 2
MAP (mmHg)	108 ± 2	106 ± 2
HR (bpm)	355 ± 7	357 ± 5
SAPV (mmHg ²)	29 ± 2	46 ± 7*
TR (bpm/mmHg)	3.0 ± 0.2	0.40 ± 0.07*
BR (bpm/mmHg)	1.51 ± 0.1	0.12 ± 0.1*
PIV (ms ²)	125 ± 18	38 ± 6*
LF (%)	32 ± 4	26 ± 4
HF (%)	69 ± 4	74 ± 4
LF/HF	0.41 ± 0.14	0.39 ± 0.10

Os dados são reportados como médias ± SEM. *p <0,05 vs C.

Tabela 2 – Medições do fluxo sanguíneo em grupos controle (C) e desnervados (SAD) - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

	Controle	SAD
CORAÇÃO	3.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3*
PULMÃO	1.31 ± 0.11	0.82 ± 0.03*
RIM	3.45 ± 0.2	1.40 ± 0.2*
GASTROCNÊMIO	0.25 ± 0.06	0.10 ± 0.02*
SOLO	1.5 ± 0.1	0.84 ± 0.2*

Os dados são reportados como médias ± SEM. *p <0,05 vs. C.

Volume sistólico, resistência periférica regional e total

O volume sistólico foi encontrado para ser significativamente diminuído em animais desnervados. Além disso, as resistências regionais e periféricas foram aumentadas nesses animais (Tabela 3).

Morfometria cardíaca

SAD induziu hipertrofia de VE como indicado pelo aumento de massa VE/BW (SAD: $2,42 \pm 0,08$ vs. C: $2,14 \pm 0,02$ mg/g). Além disso, a massa estimada de VE/PC por ecocardiografia foi aumentada nos animais SAD (SAD: $3,58 \pm$

$0,12$ vs. C: $3,42 \pm 0,06$ mg/g). (Tabela 4)

A avaliação ecocardiográfica mostrou que a parede posterior durante a diástole foi maior no grupo SAD do que no grupo controle. Os animais SAD apresentaram aumento da espessura relativa da parede em comparação com os controles. (Tabela 4)

Avaliações histológicas

As análises da morfologia cardíaca por técnicas histológicas mostraram que os ratos SAD apresentaram aumento das paredes arteriais e fibrose intersticiais (Figura 1). A morfologia renal mostrou fibrose intersticial e diminuiu o espaço de Bowmann (Figura 2).

Tabela 3 – Volume sistólico, resistência periférica regional e total em grupos controle (C) e desnervados (SAD) - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

	Controle	SAD
PERIFÉRICO	1.02 ± 0.05	$1.27 \pm 0.10^*$
CORAÇÃO	35 ± 1.8	$66 \pm 2.6^*$
PULMÃO	82 ± 4	$129 \pm 10^*$
RIM	31 ± 1.4	$75 \pm 5.4^*$
GASTROCNÊMIO	432 ± 20	$1060 \pm 38^*$
SOLO	72 ± 4	$126 \pm 6^*$
DEBITO CARDIACO	111 ± 5.4	$85 \pm 5.1^*$

Os dados são reportados como médias \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. C.

Tabela 4 – Parâmetros ecocardiográficos: DIAVE, dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo; SDIAVE, dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo; DIAEPPVE, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; ERP, espessura relativa da parede; Massa VE/PC, proporção da massa ventricular esquerda para o peso corporal no controle e grupos SAD - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

	Controle	SAD
DIAVE/PC (cm/g)	1.76 ± 0.02	1.68 ± 0.04
ESIDIAVE /PC (cm/g)	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02
DIAEPPVE /PC (cm/g)	0.32 ± 0.01	$0.39 \pm 0.01^*$
ERP (cm)	0.33 ± 0.01	$0.43 \pm 0.02^*$
Massa VE/PC (mg/g)	3.42 ± 0.06	$3.58 \pm 0.12^*$

Os dados são reportados como médias \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. C.

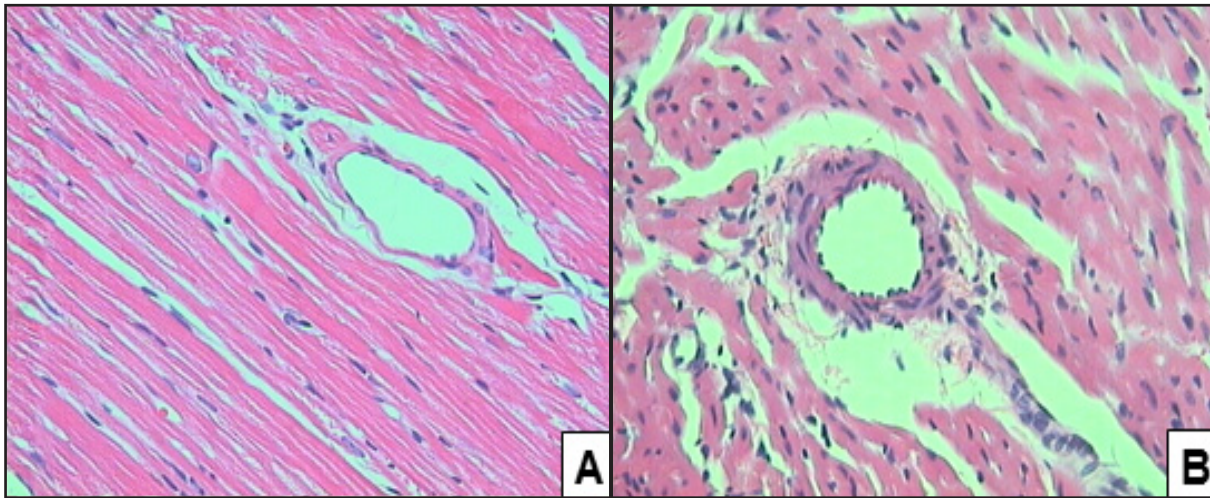


Figura 1 – Histologia Cardíaca de animais Controles (A) e SAD (B) - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

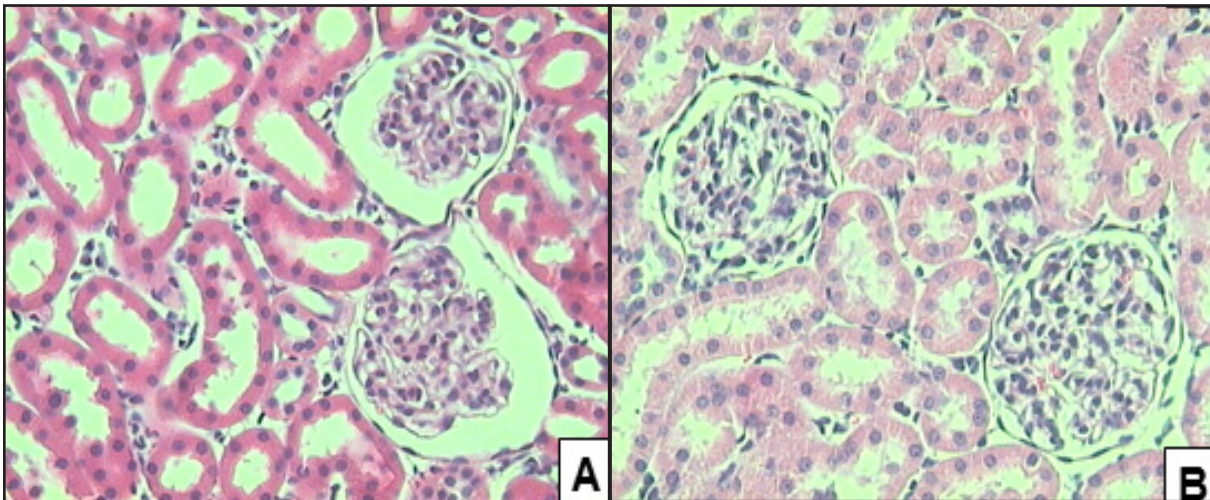


Figura 2 – Histologia Renal de animais Controles (A) e SAD (B) - 2011/Instituto do Coração (Incor/SP-Brasil).

DISCUSSÃO

Vários estudos investigaram o impacto do comprometimento barorreflexo em alterações cardiovasculares¹⁶. Esses estudos relataram que o prejuízo barorreflexo aumenta o dano do órgão final. No entanto, não está claro quais mecanismos estão relacionados a estas alterações e como um sistema autônomo influenciaria mudanças hemodinâmicas. No presente estudo, investigamos os efeitos da desnervação sino-aórtica na função cardíaca, bem como o fluxo sanguíneo e as alterações regionais da resistência e sua repercussão no dano dos órgãos alvo. Como esperado, a sensibilidade barorreflexa foi significativamente diminuída nos ratos SAD,

enquanto a variabilidade PAS foi aprimorada.

Embora o aumento da atividade simpática tônica não tenha sido observado na SAD crônica, a ausência da função inibidora barorreflexa sobre a atividade simpática pode contribuir para as respostas simpáticas aumentadas fásicas sob o estado SAD. Neste estudo, não observamos o aumento da modulação simpática como expressado pelo componente BF da VFC em animais desnervados. É importante ressaltar que essa predominância relativa simpática no coração provavelmente deve-se a um componente reduzido de AF da VFC, representativo da modulação parassimpática.

De fato, o comprometimento parassimpático foi reconhecido como marcador de risco cardiovascular em diferentes condições patológicas¹⁷. Sabe-se que a desnervação sinoaórtica aumenta a VPA e que esse é um fator importante que contribui para o dano do órgão final¹⁸. A hipertrofia cardíaca é uma característica comum das doenças cardiovasculares.

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a pressão arterial elevada é um importante determinante da hipertrofia cardíaca na hipertensão; no entanto, vários outros fatores contribuem para o processo de remodelação. Na verdade, um estudo de Miao et al. sugere que a variabilidade da pressão arterial é mais importante na determinação do dano do órgão final do que os níveis de pressão arterial⁴.

Por outro lado, SAD resultou em diminuição do fluxo sanguíneo regional e aumento da resistência total e periférica. Essas mudanças podem estar envolvidas nas alterações observadas em diferentes tecidos. Este é um achado importante, pois pode indicar outro importante mecanismo de lesão associado ao SAD. Os dados não publicados do nosso laboratório indicaram redução do débito cardíaco após SAD.

Apesar dos valores normais de PA observados após SAD, todas as resistências regionais foram aumentadas. O aumento da resistência periférica associada ao baixo débito cardíaco poderia explicar a manutenção dos valores da PA.

Além disso, essa alteração leva a uma hipertrofia cardíaca e redução no fluxo sanguíneo regional. No rim mostramos uma fibrose intersticial adequada com lesão renal. Não há dados na literatura sobre os mecanismos envolvidos no dano de órgão alvo após SAD; nossos resultados demonstram que existe uma forte relação entre barorreflexo e danos externos ao sistema cardiovascular.

Em conclusão, fornecemos evidências do papel importante do barorreflexo nos parâmetros cardíacos funcionais e hemodinâmicos. A ausência de barorreflexo, que determinou a perda do controle da atividade simpática e o aumento da variabilidade da pressão arterial, resultou em elevação da resistência regional e periférica e diminuição do volume sistólico. Esses ajustes podem estar implicados na fisiopatologia do dano de órgãos em diferentes condições patológicas; independentemente dos níveis médios de PA.

REFERÊNCIAS

1. Su DF, Chen L, Kong XB, Cheng Y. Determination of arterial baroreflex- blood pressure control in conscious rats. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:103-109.
2. Van Vliet BN, Montani JP. Baroreflex stabilization of the double product. *Am J Physiol* 1999; 277:H1679-1689.
3. Norman RG Jr, Coleman TG, Dent AC. Continuous monitoring of arterial pressure indicates sinoaortic denervated rats are not hypertensive. *Hypertension* 1981; 3:119-125.
4. Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *Hypertension*. Jun 24, 2006; 6:1125-1135.
5. Buchholtz RA, Nathan NA. Chronic lability of the arterial pressure produced by electrolytic lesions of the nucleus tractus solitarius in the rat. *Circ Res* 1984; 54:227-238.
6. Parati G, Pomidossi G, Albini F, Malaspina D, Mancia G. Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension. *J Hypertens* 1987; 5:93-98.
7. La Rovere, MT., Bigger JR, JT., Marcus FL., Mortara A., Schwartz, PJ., Baroreflex Sensitivity and Heart-Rate Variability in Prediction of Total Cardiac Mortality After Myocardial Infarction, *The Lancet*, v. 351, 1998, 478-484.
8. Schaan BD, Dall'Ago P, Maeda CY, Ferlin E, Fernandes TG, Schmid H, Irigoyen MC. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(12):1895-902.
9. Shan ZZ, Dai SM, Su DF. Arterial baroreflex deficit induced organ damage in sinoaortic denervated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 427-437.
10. Porth, Carol. *Essentials Of Pathophysiology : Concepts of Altered Health States*. Philadelphia :Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
11. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*. 1995;6:1111-1116.
12. Wichi R, Malfitano C, Rosa K, ET al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol*. Apr 26, 2007; 6:14.
13. Malliani A, Montano N. Heart rate variability as a clinical tool. *Ital Heart J*. Aug 3, 2002;8:439-445.
14. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger EM. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*. 1995;6:1111-1116.
15. De Angelis K, Gama VM, Farah VA, Irigoyen MC. Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Jan;38(1):119-25. Epub 2005 Jan 18.
16. Miao CY, Su DF. The importance of blood pressure variability in rat aortic and left ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation. *J Hypertens*. Sep 20, 2002; 9:1865-1872.
17. Su DF, Miao CY. Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep 28, 2001; 9:709-715.
18. Krieger, E.M. Neurogenic Hypertension in the rat. *Circ Res*. v.15, p. 511- 21, 1964.