

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS DO KEFIR NO BARORREFLEXO DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

LÍCIA BAIÃO DUEMKE

VILA VELHA
NOVEMBRO/2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITOS DO KEFIR NO BARORREFLEXO DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

LÍCIA BAIÃO DUEMKE

VILA VELHA
NOVEMBRO/2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

D852e

Duemke, Lícia Baião.

Efeitos do kefir no barorreflexo de ratos espontaneamente hipertensos / Lícia Baião Duemke – 2016.

49 f.: il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Hipertensão 2. Pressão arterial. I. Vasquez, Elisardo Corral. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 616.132

LÍCIA BAIÃO DUEMKE

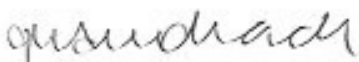
**EFEITOS DO KEFIR NO BARORREFLEXO DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do grau
de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 03 de Novembro de 2016,



Prof. Dr. Manuel Campos Toimil
Universidade de Santiago de Compostela (USC), Espanha
Membro externo



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade
Universidade Vila Velha (UVV)
Membro interno



Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Universidade Vila Velha (UVV)
Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Rachel, minha maior incentivadora e minha maior fonte de inspiração, ao meu pai, Octávio, por estar sempre presente em minha vida, aos meus irmãos, Adriana, Rodrigo e Beatriz, e aos meus sobrinhos, Felipe, Matheus e Octávio.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*
Madre Teresa de Calcutá.

AGRADECIMENTOS

Os mais sinceros agradecimentos

Ao Professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, orientador deste estudo, pela eficiência, dedicação e orientações precisas com que acompanhou este trabalho, abrindo horizontes mais amplos de análise no decorrer do mesmo.

Aos professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, pela qualidade das aulas ministradas.

Ao Professor Dr. Tadeu Uggere Andrade, pela colaboração e esforço e por gentilmente nos ceder o Kefir.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelas companhias nas aulas e pela amizade demonstrada no decorrer do mesmo.

À Brunella Faro Klippel, pelo incentivo e participação efetiva no desenvolvimento deste estudo.

Ao Marcos Leal, que desde o início me ajudou sendo fundamental nessa difícil caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Translacional, por terem feito parte dessa jornada.

À minha família, pelo encorajamento e apoio aos meus estudos e ao meu trabalho.

A Deus, por ter me feito capaz e me dado forças.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	<i>Hipertensão arterial</i>	12
1.2	<i>Controle da circulação pelo barorreflexo</i>	13
1.3	<i>O probiótico Kefir</i>	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	<i>Objetivo geral</i>	18
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	<i>Animais</i>	19
3.2	<i>Preparação e administração do Kefir</i>	19
3.3	<i>Medidas hemodinâmicas</i>	20
3.4	<i>Sensibilidade do barorreflexo</i>	20
3.5	<i>Análise estatística</i>	21
4	RESULTADOS	22
4.1	<i>Hemodinâmica</i>	22
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração esquemática do arco reflexo de controle neural da pressão arterial (PA) e técnica de ativação e desativação do mesmo através do vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS) e da fenilefrina (Phe). São também esquematizadas as vias aferentes e eferentes do arco reflexo, bem como os sensores e efetores do sistema	15
Figura 2	Fotomicrografias de grãos de Kefir obtidos por meio de câmera digital e (a) microscopia eletrônica de varredura do exterior (b-d) e interior (e, f) da superfície de um grão de Kefir. Na superfície exterior (c, d) encontramos a prevalência de bacilos em estreita associação com a matriz polissacarídea (Kefiran). Na superfície interior encontramos em forma de bastonete os bacilos que crescem em associação com leveduras (e, f)	17
Figura 3	Pressão arterial e frequência cardíaca basais aferidas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados por 30 e 60 dias com grãos ou fração solúvel de Kefir, comparados com os SHR tratados com o veículo (leite integral) e com os normotensos Wistar	22
Figura 4	Registros típicos do barorreflexo, caracterizado por taquicardia em resposta às quedas de pressão arterial e bradicardia em resposta aos aumentos da pressão arterial, induzidas pela administração intravenosa do vasodilatador nitroprussiato de sódio (↓) e do vasoconstritor fenilefrina (↑) em ratos normotensos (Wistar) e ratos espontaneamente hipertensos não tratados (SHR) e também tratados com o probiótico Kefir durante 60 dias	23
Figura 5	Esquema simplificado de como são obtidas as barocurvassigmoidais. Os valores pressão arterial (PA) basal e de frequência cardíaca (FC) basal (círculo em linha pontilhada) são alterados com injeções “in bolus” ou por infusão do vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS) ou do vasoconstritor adrenérgico fenilefrina (Fen). As respostas reflexas cronotrópicas são plotadas em diferentes níveis pressóricos. As barocurvas são caracterizadas por um platô inferior de bradicardia reflexa e um superior de taquicardia reflexa, os quais, juntamente com o intervalo entre ambos, bem como o valor de pressão no ponto médio da sigmoide, são utilizados no algoritmo	25
Figura 6	Avaliação da função do barorreflexo em ratos SHR tratados por 60 dias com Kefir obtido pela fermentação de seus grãos em leite integral, em comparação com ratos da mesma linhagem tratados com o veículo (leite integral somente). No painel superior são mostradas as sigmóides de cada grupo. Os pontos ao longo da linha representam os valores da média do grupo de animais para aquele nível de alteração da pressão arterial. No painel inferior são mostradas as respectivas primeiras derivadas das funções acima, representando a sensibilidade do reflexo a cada nível da barocurva .	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros calculados, os quais foram utilizados na construção do algoritmo para gerar as barocurvas	26
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIações

ANOVA - análise de variância de uma via

CVLM - bulbo ventrolateral caudal

FC - frequência cardíaca

NA - núcleo ambíguo

NDMV - núcleo dorsal motor do vago

NTS - núcleo do trato solitário

PA - pressão arterial

PAM - pressão arterial média

PAP - pressão arterial pulsátil

RVLM - bulbo ventrolateralrostral

SHR - Ratos espontaneamente hipertensos

RESUMO

Duemke, Licia Baião, Universidade Vila Velha - ES, novembro de 2016 -**EFEITOS DO KEFIR NO BARORREFLEXO DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**. Orientador: Elisardo Corral Vasquez

Sabe-se que vários probióticos, dentre os quais o Kefir, apresentam efeitos benéficos nos níveis altos de pressão arterial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do tratamento crônico do Kefir sobre o barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Ratos Wistar e SHR machos adultos foram divididos em três grupos –Wistar, SHR e SHR-Kefir– tratados por 60 dias com Kefir (0,3ml/100g) via gavagem. Os níveis basais de pressão arterial e frequência cardíaca foram avaliados no animal nãoanestesiado, 24 a 48 horas após a implantação de cateteres na artéria femoral e veia femoral. O ganho (ou sensibilidade) do barorreflexo foi avaliado nos animais acordados por meio de aumentos ou diminuições da pressão arterial, através de injeções *in bolus* de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. As alterações de frequência cardíaca em função das alterações de pressão arterial foram analisadas por tratamento matemático, resultado em sigmóides ajustadas, denominadas barocurvas. Os valores basais pressão arterial e frequência cardíaca foram significativamente maiores no grupo SHR (168 ± 7 mmHg e 330 ± 10 bpm) do que nos ratos Wistar (102 ± 6 mmHg e 287 ± 10 bpm). Kefir atenuou significativamente esses valores do SHR (152 ± 9 mmHg e 310 ± 11 bpm). A análise das barocurvas mostrou uma significativa diminuição da sensibilidade do barorreflexo no grupo SHR ($-3,6 \pm 0,3$ bpm/mmHg), quando comparado com os ratos normotensos Wistar ($-6,0 \pm 0,4$ bpm/mmHg). Por outro lado, o tratamento dos SHR com Kefir durante 60 dias melhorou, mas não reverteu completamente o ganho do barorreflexo ($-4,1 \pm 0,3$ bpm/mmHg). Isto é, tanto a taquicardia como a bradicardia reflexas foram mais intensas em resposta às alterações pressóricas induzidas pelas drogas vasoativas. Estes dados, explicitados no corpo da dissertação de mestrado, nos levam a concluir que o tratamento de SHR por 60 dias resulta numa atenuação do prejuízo do barorreflexo observado neste modelo. Não foi possível, no entanto saber se o prejuízo do barorreflexo é causa ou consequência da atenuação significativa da pressão arterial e frequência cardíaca basais.

Palavras chave: Hipertensão arterial, Kefir, barorreflexo, pressão arterial, frequência cardíaca, ratos espontaneamente hipertensos.

ABSTRACT

Dueenke, LiciaBaião, Vila Velha University - ES, november 2016- **EFFECTS OF KEFIR ON THE BAROREFLEX IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.**

Supervisor: Elisardo Corral Vasquez, Ph.D.

Studies have shown that the probiotics, including Kefir, exhibit beneficial effects in the treatment of hypertension. The aim of this study was to evaluate the effect of chronic treatment with Kefir on arterial baroreflex in spontaneously hypertensive rats (SHR). Male Wistar and SHR rats at 4 months of age, were separated into 3 groups Wistar, SHR and SHR-Kefir treated for 60 days with Kefir (0,3ml/100g) by gavage. Basal levels of arterial pressure and heart rate were evaluated in conscious animals 24 to 48 hours after catheterization of femoral artery and vein under anesthesia. The baroreflex gain (sensitivity) was tested in conscious animals through increases or decreases in blood pressure by bolus injections of phenylephrine and sodium nitroprusside. The heart rate data changes in function of arterial pressure changes were subjected to a logistic sigmoidal equation (fitting barocurves) to determine the gain of the baroreflex. As expected the SHR group had higher levels of arterial pressure and heart rate (168 ± 7 mmHg and 330 ± 10 bpm) compared to Wistar rats (102 ± 6 mmHg and 287 ± 10 bpm). Kefir treatment significantly attenuated these parameters (152 ± 9 mmHg and 310 ± 11 bpm). The baroreflex sensitivity was significantly decreased in SHR group ($-3,6 \pm 0,3$ bpm/mmHg), when compared to the Wistar group ($-6,0 \pm 0,4$ bpm/mmHg). In the SHR rats treated with Kefir the gain was initiatively improved ($-4,1 \pm 0,3$ bpm/mmHg). Thus, both the reflex tachycardia and the reflex bradycardia were of higher magnitude in response to the changes in arterial pressure. These data, described in the text of this dissertation lead us to the conclusion that the treament of SHR for 60 days with Kefir results in imrovment of the baroreflex function in the modelof hypertension. However, our data do not allow us to know if the de baroreflex function is cause or consequence of the high levels of arterial pressure.

Keywords: Arterial hypertension, Kefir, baroreflex, heart rate, spontaneously hypertensive rats.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças crônicas não transmissíveis, a prevalência de doenças cardiovasculares tem crescido em decorrência de vários fatores em nível mundial, conforme vem sendo alertado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013). Dentre os fatores de risco para as doenças cardiovasculares, a hipertensão arterial sistêmica se destaca por ser um dos mais importantes (Kearney *et al.*, 2005).

1.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica determinada por elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias, fazendo com que o coração exerça um esforço maior do que o normal para bombear o sangue através dos vasos sanguíneos (Anadón *et al.*, 2010). Dentre os vários mecanismos pelos quais a hipertensão ocorre, destacam-se de maneira interativa (mosaico de Page), fatores genéticos, ambientais, disfunção endotelial e controle neural da circulação, obesidade, a taxa de ingestão de sal, o consumo de bebidas alcoólicas, o sedentarismo, fatores socioeconômicos e atividade cardíaca (SBH, 2010; WHO, 2013). Essa multiplicidade de consequências caracteriza a HAS como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan *et al.*, 2006). As VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial publicadas no ano de 2010 informam que aproximadamente 25% da população mundial adulta tem hipertensão arterial e estima que até 2025 a prevalência pode aumentar para 29%. Em relação ao Brasil, em diversas cidades, a hipertensão já acomete 30% dos adultos.

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) têm sido utilizados como uma ferramenta importante para a compreensão da hipertensão arterial e outras disfunções cardiovasculares, bem como para a identificação de agentes alternativos ou não farmacológicos para a prevenção/tratamento destas doenças (Monteiro *et al.*, 2012; Friques *et al.*, 2015; Barbosa Neto *et al.*, 2013; Ceroni *et al.*, 2009). Uma característica relevante deste modelo de hipertensão essencial é um controle

nervoso autônomo anormal (Moreira et al., 2013; Monteiro *et al.*, 2012; Barbosa Neto *et al.*, 2013; Ceroniet *al.*, 2009), associado com lesão de órgãos alvos (Suet *al.*, 2001; Abboud 2010; Abboudet *al.*, 2012). Neste modelo de hipertensão ocorre um tônus parassimpático cardíaco (vagal) diminuído, um tônus simpático cardíaco aumentado e um tônus vasomotor simpático aumentado, quando comparados com ratos Wistar normotensos (Ceroniet *al.*, 2009; Barbosa Neto *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2012). Do mesmo modo, ou consequência disto, a sensibilidade barorreflexa está diminuída nestas condições (Barbosa Neto *et al.*, 2013) e também na hipertensão secundária (Moysés *et al.*, 1994; Campagnaro *et al.*, 2012).

1.2 Controle da circulação pelo barorreflexo

A regulação neural autonômica da circulação através do sistema simpático e parassimpático fornece para os órgãos uma perfusão ideal, de acordo com as suas necessidades metabólicas (Vasquez *et al.*, 2012). O sistema nervoso simpático exerce uma ação excitatória no coração e vasos sanguíneos, enquanto que a inervação parassimpática cardiovagal exerce uma ação inibidora sobre o coração (Campagnaro, 2012). Por isso, o barorreflexo é de grande importância na regulação da função cardiovascular. O reflexo barorreceptor arterial (ou barorreflexo) é um dos mecanismos mais poderosos e rápidos para controlar a pressão arterial (PA), promovendo momento a momento uma regulação, impedindo a labilidade da PA, pois nos mamíferos isto é muito importante. Um aumento imediato na PA provoca um aumento reflexo da atividade vagal cardíaca e uma diminuição da atividade simpática cardíaca e vascular, resultando em uma diminuição da frequência cardíaca (FC) e na correção da PA. Por outro lado, em resposta a uma queda da PA, a atividade cardiovagal é inibida e a atividade simpática cardíaca e vascular é aumentada, causando um aumento da FC e um ajuste da PA conforme pode ser visto no esquema da Figura 1 (Vasquez, *et al.*, 2012). A cada sístole cardíaca, a PA gerada deforma as paredes desses vasos, levando a uma despolarização do barorreceptor, o que leva ao aumento da frequência de potenciais de ação transmitidos pelas fibras aferentes dos nervos depressor aórtico e sinusal,

os quais se unem respectivamente aos nervos vago e glossofaríngeo, fazendo sinapse no núcleo do trato solitário (NTS), localizado no bulbo dorsal (Chapleau *et al.*, 1995; Irigoyen *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2010). Assim, neurônios do NTS excitam neurônios parassimpáticos no núcleo dorsal motor do vago (NDMV) e no núcleo ambíguo (NA), cujos axônios se projetam para o coração. Contrariamente, neurônios provenientes do NTS se dirigem para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), o qual envia estímulos inibitórios que irão se projetar para o bulbo ventrolateralrostral (RVLM), que são projetados aos neurônios simpáticos da coluna intermédio-lateral (Irigoyen *et al.*, 2001; Vasquez *et al.*, 1997). O oposto acontece frente a reduções nos níveis da PA. Se houver uma diminuição, há uma menor deformação da parede, que geram menos potenciais de ação que são conduzidos para o NTS, havendo uma inibição do NA e NDMV, desencadeando uma diminuição da atividade parassimpática cardíaca. Simultaneamente, CVLM estará menos estimulado, diminuindo a inibição sobre RVLM, que aumenta a atividade simpática cardíaca e vascular. Consequentemente ocorrerá uma diminuição da atividade vagal, um aumento da FC, da contratilidade cardíaca, da resistência vascular periférica e do retorno venoso, aumentando a PA reflexamente (Figura 1, parte inferior) (Irigoyen *et al.*, 2001; Vasquez *et al.*, 1997; Silva, 2010). Conforme ilustrado na Figura 1, o barorreflexo é tradicionalmente avaliado por meios farmacológicos, embora seja crescente número de estudos sobre o barorreflexo espontâneo (Silva *et al.*, 2009).

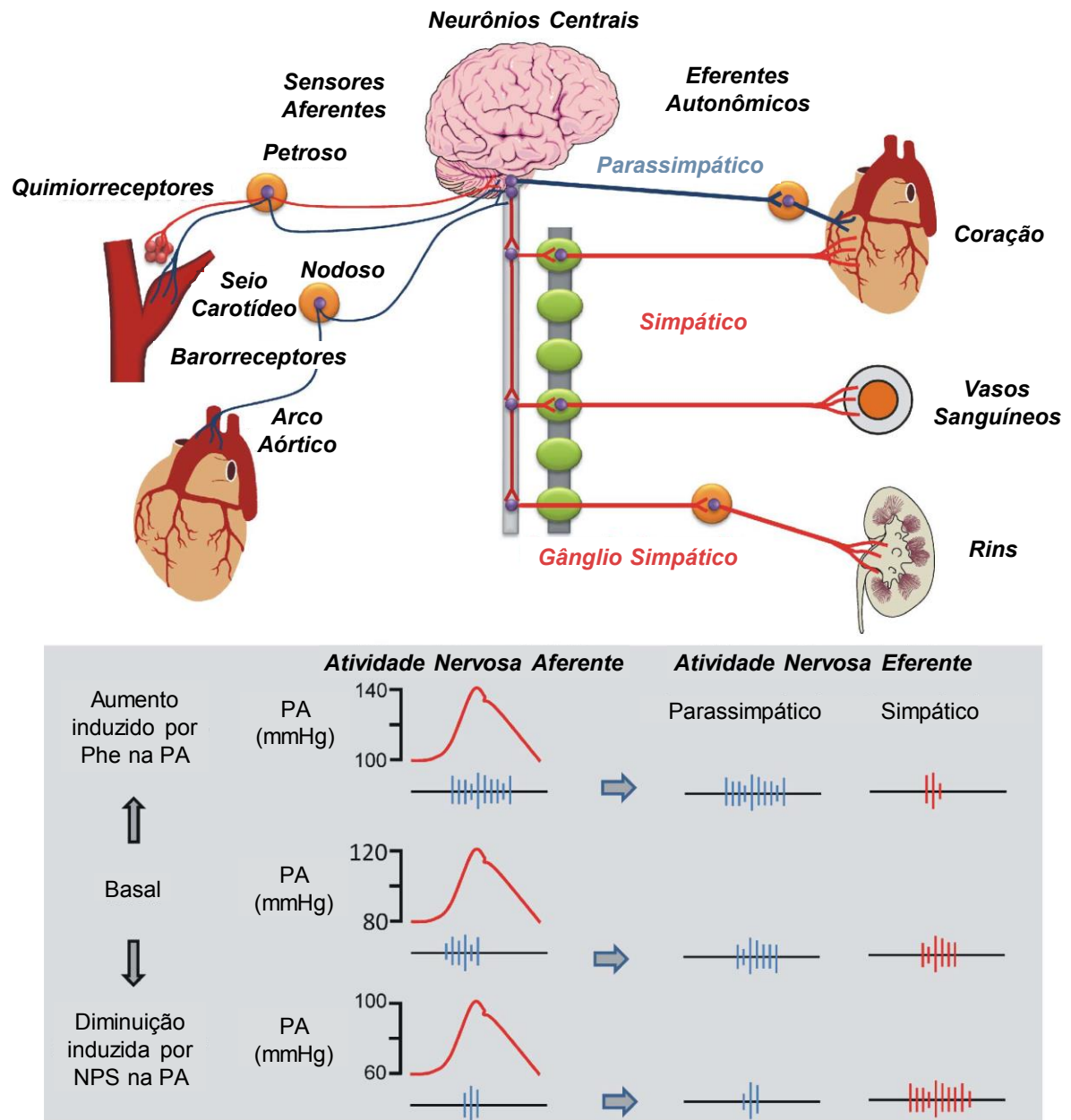


Figura 1. Ilustração esquemática do arco reflexo de controle neural da pressão arterial (PA) e técnica de ativação e desativação do mesmo através do vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS) e da fenilefrina (Phe). São também esquematizadas as vias aferentes e eferentes do arco reflexo bem como os sensores e efetores do sistema. Fonte: Vasquez et al., 2012.

1.3 O probiótico Kefir

Embora existam várias opções e condutas farmacológicas para o tratamento da hipertensão arterial, é cada vez maior a necessidade e procura por formas alternativas de prevenção e tratamento da mesma, em especial quando o indivíduo apresenta refratariedade ao tratamento convencional. Por outro lado, há uma enorme carência sobre condutas não farmacológicas visando também a correção dos distúrbios de controle neural da circulação que ocorrem nos processos hipertensivos.

Nesse sentido, tem crescido a procura pelo uso de probióticos, isto é, o uso de micro-organismos utilizados no processo de fermentação e que quando administrados em quantidades adequadas exercem um efeito benéfico à saúde do consumidor. Estudos recentes experimentais e clínicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos alimentos funcionais (Monteiro *et al.*, 2012; Friqueset *al.*, 2015), incluindo a diminuição da pressão arterial e a atenuação da disfunção endotelial (Friqueset *al.*, 2015). Entre as opções, temos o uso do Kefir, o qual foi demonstrado em nosso laboratório que, quando administrado em SHR, resulta em diminuição da pressão arterial e melhora da função endotelial vascular, após 60 dias de tratamento (Friqueset *al.*, 2015).

Trata-se de uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de Kefir. A bebida tem origem na Ásia central, entre as montanhas caucasianas e a Mongólia, e traz promessas de vários benefícios para a saúde. O nome “Kefir” significa “sentimento bom” (Wszoleket *al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2014; Lopitz-Otsoaet *al.*, 2006; Sarkar, 2007). O Kefir preparado pela fermentação dos grãos em leite integral é uma forma bastante consumida pela população brasileira, mas suas propriedades funcionais ainda são pouco relatadas na literatura (Sakar, 2007). Os principais produtos da fermentação do Kefir são o ácido láctico, o etanol e o CO₂, que irão conferir a viscosidade, a acidez e o baixo teor de álcool (Leite *et al.*, 2013). Os grãos de Kefir variam de tamanho, de 0,3 a 3,0 cm de diâmetro (Figura 2) e têm uma composição microbiológica complexa. Consistem de uma mistura de bactérias ácido-lácticas (aproximadamente 83-90%) e leveduras (aproximadamente 10-17%) (Wszoleket *al.*,

2006). Um estudo feito em nosso laboratório realizando-se a microbiologia e análise de microscopia eletrônica de varredura no grão de Kefir mostrou que o biofilme presente no grão é composto majoritariamente por bacilos curvos curtos e longos ou por leveduras de forma ovoide, e que a microflora dominante do Kefir inclui várias espécies de bactérias benéficas, incluindo bactérias como *Lactobacillus kefirianofaciens*, e leveduras, como *Candida famata* e *Candida krusei*. Possui também uma contagem de microrganismos total de $7,5 \times 10^7$ UFC/mL (Frigues *et al.*, 2015).

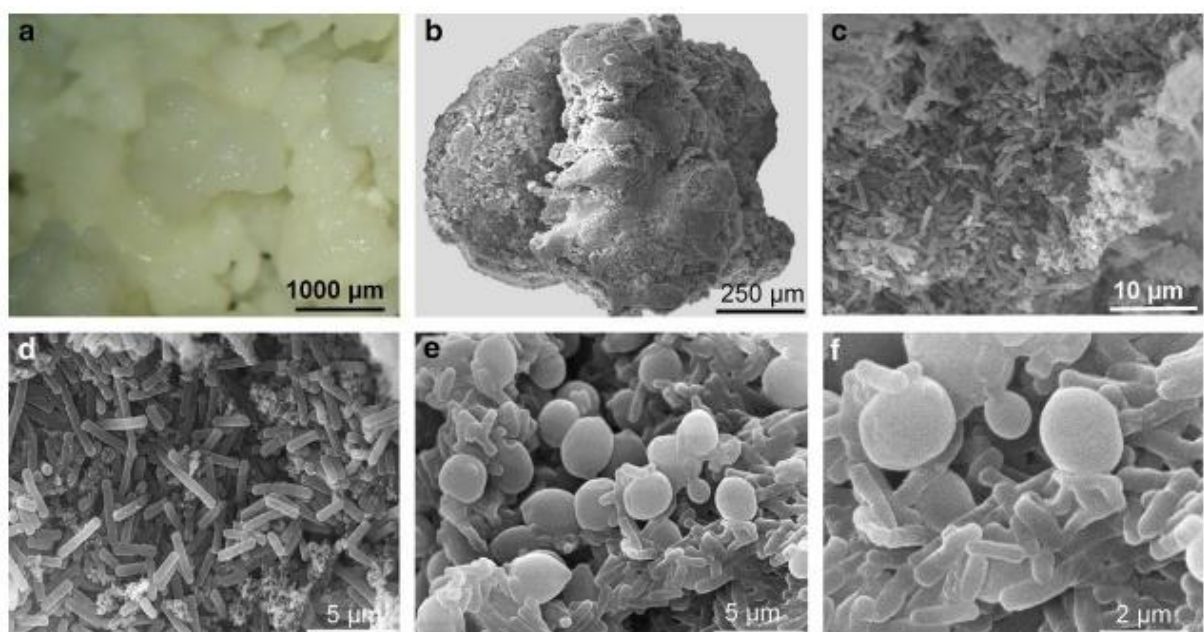


Figura 2. Fotomicrografias de grãos de Kefir obtidos por meio de câmera digital (a) e microscopia eletrônica de varredura do exterior (b-d) e interior (e, f) da superfície de um grão de Kefir. Na superfície exterior (c, d) encontramos a prevalência de bacilos em estreita associação com a matriz polissacarídea (Kefiran). Na superfície interior encontramos em forma de bastonete os bacilos que crescem em associação com leveduras (e, f). Fonte: Friques *et al.*, 2015.

Portanto, faz-se necessário o estudo sobre terapias não medicamentosas que possam impedir o agravamento da hipertensão arterial e com isto minimizar os efeitos colaterais que teriam os medicamentos tradicionalmente utilizados. Neste sentido, o presente projeto visa estudar os efeitos do tratamento crônico com Kefir sobre o controle neural da pressão arterial neste modelo experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade do barorreflexo no controle neural da circulação.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do Kefir na pressão arterial e frequência cardíaca basais. Determinar a sensibilidade do barorreflexo no modelo experimental SHR. Verificar se o Kefir administrado cronicamente a estes animais melhora a sensibilidade do barorreflexo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente estudo foi realizado em SHR machos de 4 meses de idade e em ratos Wistar da mesma idade. Os ratos foram alojados no biotério da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, mantidos em gaiolas de plástico individuais, aclimatizados com uma temperatura controlada (22-23°C), ciclo claro-escuro (12:12-h) e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado Animal (CEUA-UFES, protocolo nº 040/2014). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório, como recomendado pelo National Institutes of Health (NIH).

3.2 Preparação e administração do Kefir

A identificação, preparação e administração do Kefir foi como descrito anteriormente (Frigues *et al.*, 2015). Foi obtido a partir da fermentação dos grãos em leite integral e as bactérias e leveduras foram identificadas utilizando quatro diferentes meios de Agar. A preparação do Kefir foi por adição de grãos em leite integral na proporção de 4% (m/v) e mantidos à temperatura ambiente. Um dia após, a mistura foi filtrada e o produto resultante foi refrigerado a 10°C para permitir o crescimento de leveduras durante 24 horas. Em seguida, foram feitas alíquotas de Kefir em tubos estéreis de plástico armazenados a -20°C até a sua utilização.

Um grupo de SHR foi tratado com Kefir (0,3mL/100g de peso corporal, por gavagem) durante 60 dias, baseados no trabalho anterior de Frigues *et al.* (2015). Em outro grupo de SHR foi administrado leite integral (0,3ml/100g, pH ajustado para 4,5) durante 60 dias para serem utilizados como controle de hipertensão. Os ratos Wistar receberam leite integral pelo mesmo período e foram utilizados como grupo controle normotenso.

3.3 Medidas hemodinâmicas

Para a realização da medida direta da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e FC, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg). Foi realizada a cateterização da artéria e veia femoral para medida da PA e FC e injeção de drogas, respectivamente. A cânula utilizada foi confeccionada com tubos de polietileno PE-10 (*IntramedicPolyethyleneTubing, Clay Adams, Becton, Dickinson andCompany, Nova Jérsei, EUA*), acoplados a outro tubo de polietileno PE-50. A artéria e a veia foram cateterizadas e as porções PE-50 foram transpassadas sob a pele até o dorso, onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas por meio de fios de sutura nas costas do animal.

Esses animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura e luminosidade controladas durante 24 horas para recuperação. Após um período de estabilização de 30 minutos foram registradas as ondas de pulso arterial, a partir dasquais foi obtida a pressão arterial média, e também as medidas de frequência cardíaca. Os parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial e frequência cardíaca foram obtidos através da onda de pulso arterial detectada por um transdutor de pressão (*BIOPAC Systems, Inc., Califórnia, EUA*) conectado ao sistema de aquisição de dados biológicos (*BIOPAC*). Esses dados eram enviados ao computador e processados, como pode ser observado em um dos registros obtidos no presente estudo. Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com Kefir sobre os valores pressóricos e de frequência cardíaca dos animais hipertensos.

3.4 Sensibilidade do barorreflexo

O controle barorreflexo da pressão arterial foi avaliado em animais acordados através da medida das alterações de frequência cardíaca em resposta ao aumento ou diminuição da pressão arterial 24 a 48 horas após a instrumentação cirúrgica para medidas hemodinâmicas. Após estabilização da pressão arterial e

frequência cardíaca por 30 a 60 min, com o animal nãoanestesiado, livre mas quieto em sua gaiola individualizada, foi iniciado o teste. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, foram administradas doses *in bolus* de fenilefrina (de pelo menos 2ug/kg; Sigma Chemical, St. Louis, MO) e nitroprussiato de sódio (no mínimo de 2 ug/kg; Hypofarma, Belo Horizonte), para induzir um aumento ou uma diminuição da pressão arterial, respectivamente, concedendo-se um intervalo de, no mínimo, 10 min entre cada dose e outra para que os níveis de pressão e frequência retornassem a valores próximos aos basais.

O pico dos valores de pressão arterial e de frequência cardíaca em resposta a fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram ajustados (“fitted”) numa equação logística sigmoidal. O método de ajuste ótimo da curva foi similar ao modo já praticado em trabalhos anteriores:

$$FC = P_1 + P_2 / [1 + e^{P_3(PA - P_4)}],$$

onde

P_1 é o platô inferior;

P_2 é o intervalo de frequência cardíaca entre os platôs superior e inferior;

P_3 é o coeficiente da curva; e

P_4 é o valor de pressão arterial no ponto médio de P_2 .

O ganho (sensibilidade) foi calculado baseado na primeira derivada da função sigmoidal.

3.5 Análise estatística

Os valores foram expressos como média±EPM. As comparações estatísticas entre os diferentes grupos foram realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por teste *post hoc* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada através do software Prism versão 6.07.

4 RESULTADOS

Os animais SHR, conforme esperado, apresentaram características já conhecidas nesse modelo, tais como pelos mais eretos e não tão brancos como os Wistar, bem como deixaram de ganhar o mesmo peso que os Wistar (ao final dos 6 meses: Wistar 328 ± 3 g vs 480 ± 8 g de peso corporal, $p < 0.05$). O tratamento com Kefir não modificou seu aspecto visual e comportamental e ao final do tratamento pesavam 326 ± 4 g ($p < 0,05$ vs Wistar).

4.1 Hemodinâmica

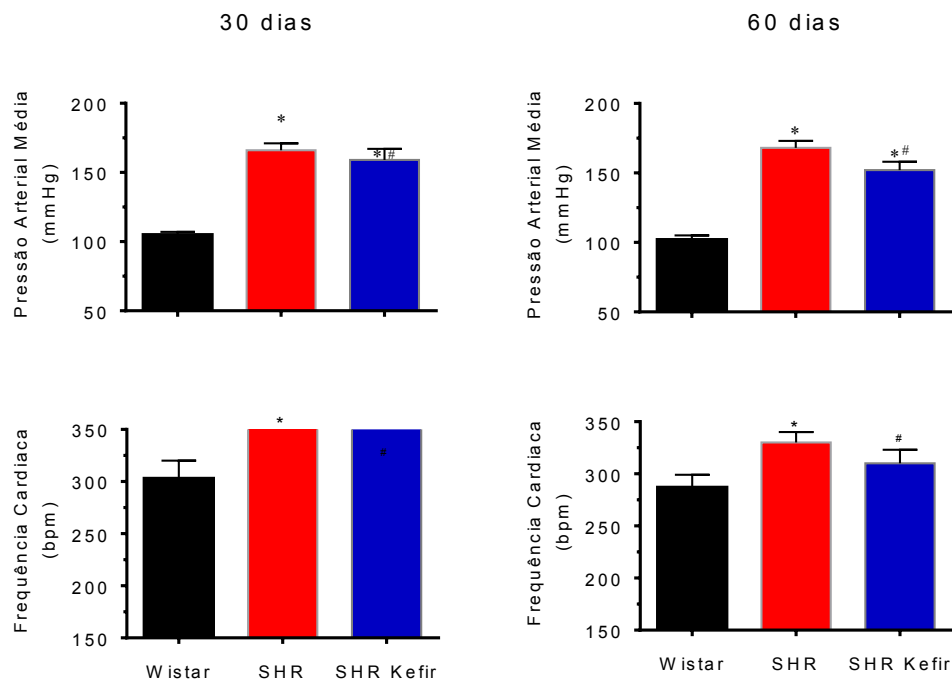


Figura 3. Pressão arterial e frequência cardíaca basais aferidas em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados por 30 e 60 dias com grãos ou fração solúvel de Kefir, comparados com os SHR tratados com o veículo (leite integral) e com os normotensos Wistar. Os valores indicam a média $\pm$ EPM para grupos de 8 animais. * $p < 0,05$ vs Wistar e # $p < 0,05$ vs SHR. Fonte: a autora.

Como esperado, animais SHR exibiram significativamente altos níveis de pressão arterial média e de frequência cardíaca basais (168 ± 7 mmHg e 330 ± 10 bpm; $p < 0,05$) comparados com os ratos Wistar (102 ± 2 mmHg e 287 ± 10 bpm)

(Figura 3). A administração de Kefir por 30 dias não causou efeito significativo sobre a pressão arterial e frequência cardíaca dos animais. O efeito benéfico do Kefir foi notado quando a administração foi de 60 dias, o que provocou uma atenuação significativa da pressão arterial e da frequência cardíaca, que foram reduzidas para 152 ± 9 mmHg e 310 ± 11 bpm ($p < 0,05$).

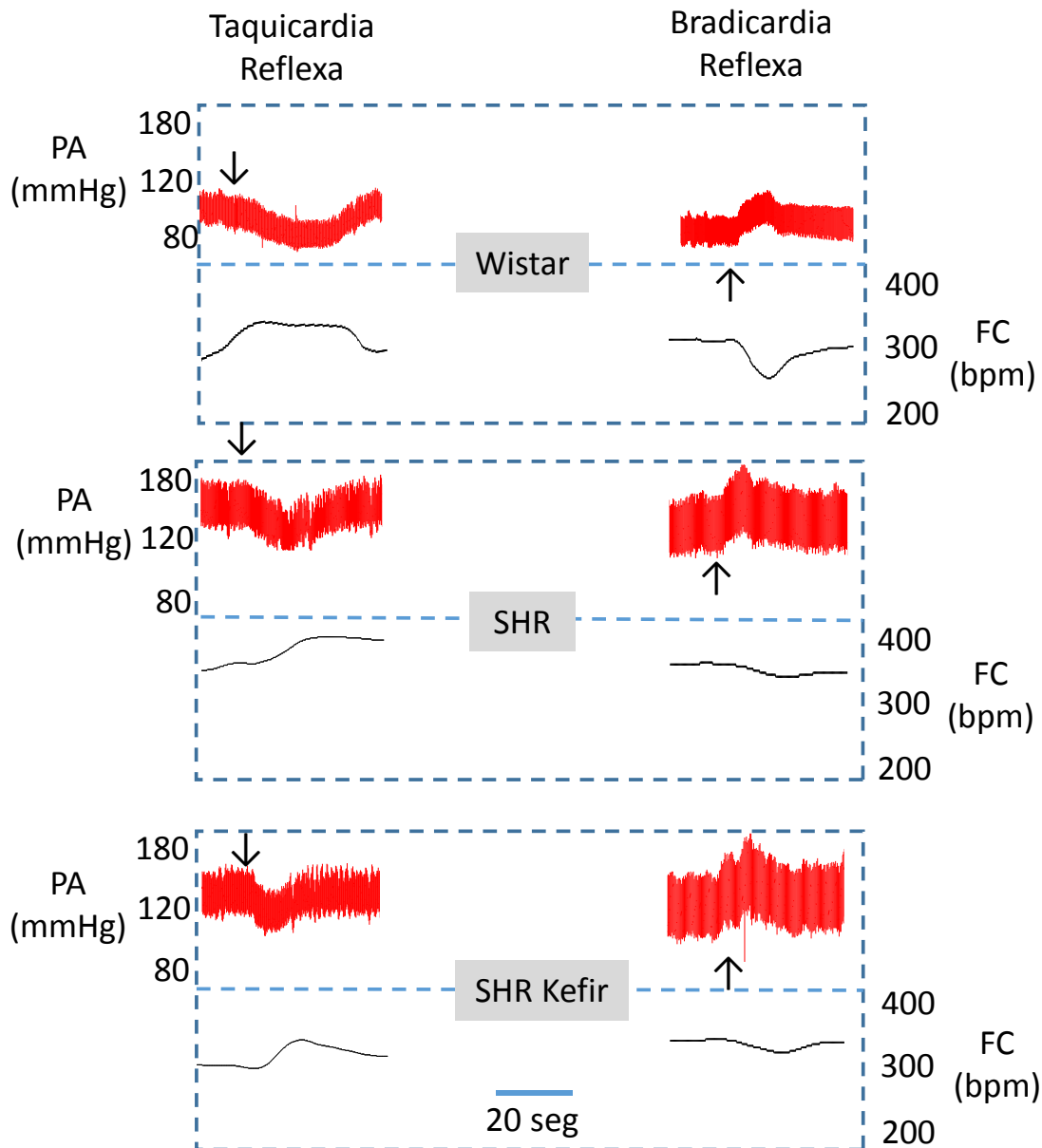


Figura 4. Registros típicos do barorreflexo, caracterizado por taquicardia em resposta às quedas de pressão arterial e bradicardia em resposta aos aumentos da pressão arterial, induzidas pela administração intravenosa do vasodilatador nitroprussiato de sódio (↓) e do vasoconstritor fenilefrina (↑) em ratos normotensos (Wistar) e ratos espontaneamente hipertensos não tratados (SHR) e também tratados com o probiótico Kefir durante 60 dias. Fonte: a autora.

Os registros típicos mostrados na Figura 4 são modificações/adaptações do nosso artigo publicado: Klippelet *al.*, 2016. Os efeitos da administração de Kefir na sensibilidade do barorreflexo em SHR são mostrados nas figuras seguintes. Como mostrado nos registros típicos (Figura 4) e conforme esperado, o barorreflexo desafiado por aumentos moderados induzidos por fenilefrina na pressão arterial, o grupo SHR mostrou uma significativa diminuição no reflexo de bradicardia (~50%, $p < 0,05$), quando comparado com o grupo Wistar e, conseqüentemente, uma significativa redução no ganho do barorreflexo ($-3,6 \pm 0,3$ bpm/mmHg, $p < 0,05$) (Figura 4). O tratamento de animais SHR com Kefir por 60 dias resultou em leve, mas significativa, melhora do reflexo de bradicardia (~40%, $p < 0,05$) e também no ganho do barorreflexo ($-4,1 \pm 0,3$ bpm/mmHg; $p < 0,05$).

Esquema e Exemplos de Barocurvas Sigmoidais Ajustadas

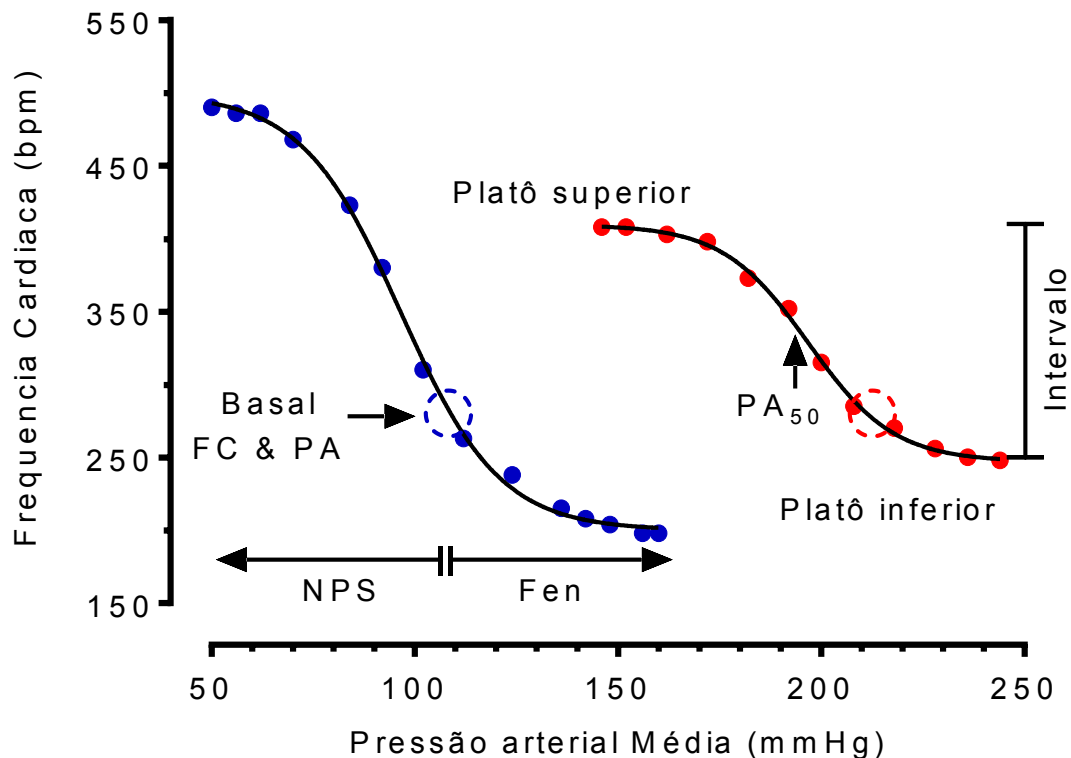


Figura 5. Esquema simplificado de como são obtidas as barocurvas sigmoidais. Os valores pressão arterial (PA) basal e de frequência cardíaca (FC) basal (círculo em linha pontilhada) são alterados com injeções “in bolus” ou por infusão do vasodilatador nitroprussiato de sódio (NPS) ou do vasoconstritor adrenérgico fenilefrina (Fen). As respostas reflexas cronotrópicas são plotadas em diferentes níveis pressóricos. As barocurvas são caracterizadas por um platô inferior de bradicardia reflexa e um superior de taquicardia reflexa, os quais, juntamente com o intervalo entre ambos, bem como o valor de pressão no ponto médio da sigmoide, são utilizados no algoritmo (Meyrelles *et al.*, 1996).

A Figura 5 esquematiza simplificada o método farmacológico de determinação da sensibilidade do barorreflexo, no qual notam-se detalhes dos componentes que são manipulados na forma de algoritmo, visando a construção das curvas da relação inversa entre pressão arterial e frequência cardíaca, as chamadas barocurvas sigmoides. Os parâmetros que foram gerados e usados para construção das barocurvas nos três grupos de animais são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros calculados, os quais foram utilizados na construção do algoritmo para gerar as barocurvas.

Parâmetros	Grupos		
	Wistar (8)	SHR (8)	SHR Kefir (8)
Intervalo (bpm)	291±10	125±11*	217±11*#
PAM ₅₀ (mmHg)	98±10	189±11*	148±10*#
Platô superior (bpm)	490±12	399±12*	465±15*#
Platô inferior (bpm)	199±8	272±10*	249±7*
Ganho (bpm/mmHg)	-6.0±0.4	-3.6±0.3*	-4.1±0.3*#

Fonte: a autora.

Conforme sumarizado na Figura 6, o grupo de animais SHR mostrou uma diminuição na amplitude da barocurva para 125±11 bpm, quando comparado com o valor observado no grupo de animais Wistar (291±10 bpm). O tratamento dos animais SHR com Kefir causou uma diminuição desses valores para 217±11 bpm (Figura 6 e Tabela 1). Esse intervalo diminuído no SHR foi decorrente de um menor platô superior e inferior, comparado com os Wistar, e os quais foram parcialmente revertidos nos SHR tratados com Kefir por 60 dias.

A partir desses parâmetros foi calculado o ganho ou sensibilidade do barorreflexo, o qual foi de -3.6±0.3 bpm/mmHg nos SHR e parcialmente recuperado com o tratamento com Kefir para -4.1±0.3 bpm/mmHg, valor este estatisticamente diferente do observado no grupo SHR e Wistar.

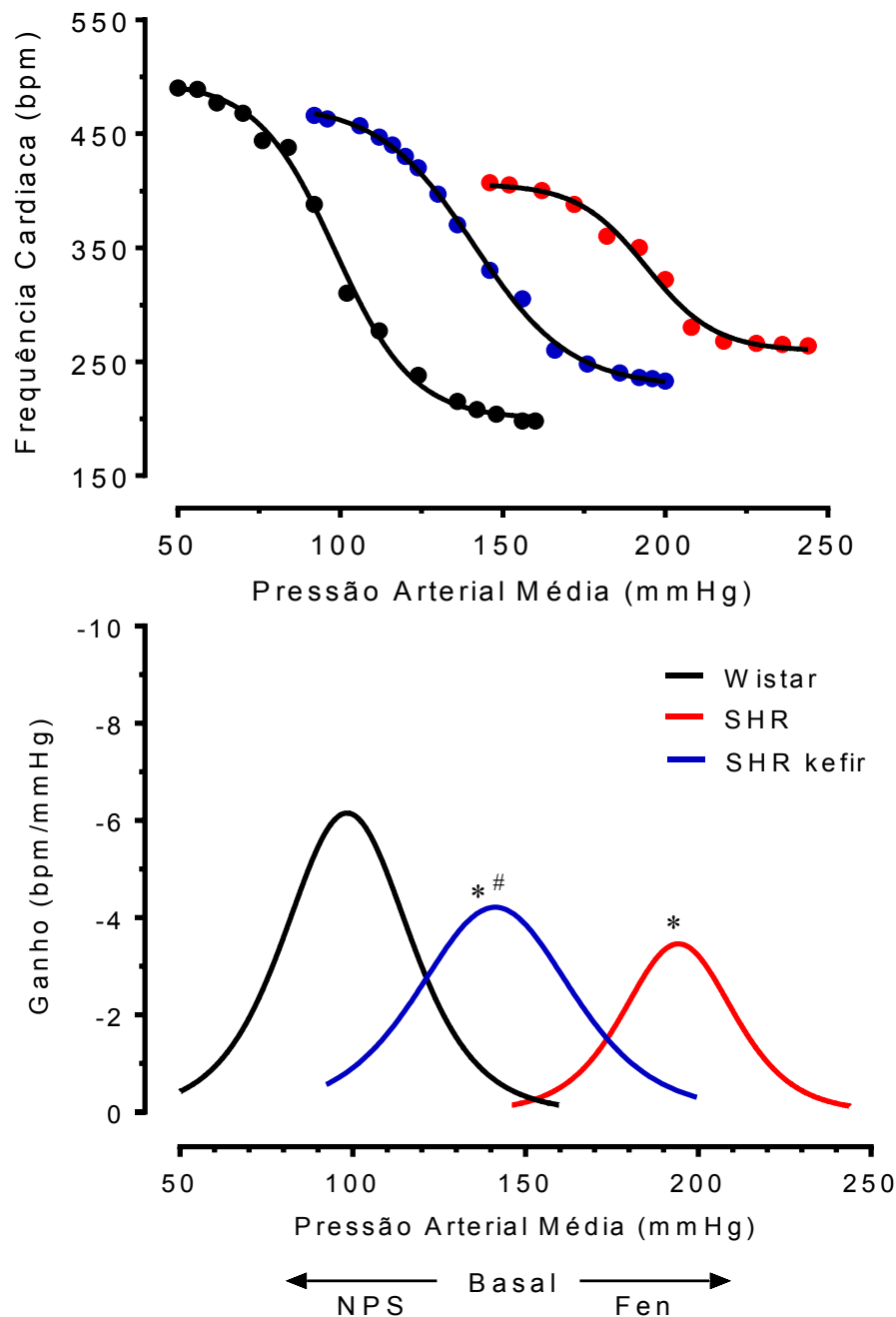


Figura 6. Avaliação da função do barorreflexo em ratos SHR tratados por 60 dias com Kefir obtido pela fermentação de seus grãos em leite integral, em comparação com ratos da mesma linhagem tratados com o veículo (leite integral somente). No painel superior são mostradas as sigmóides de cada grupo. Os pontos ao longo da linha representam os valores da média do grupo de animais para aquele nível de alteração da pressão arterial. No painel inferior são mostradas as respectivas primeiras derivadas das funções acima, representando a sensibilidade do reflexo a cada nível da barocurva. A curva da primeira derivada tem seu ponto máximo correspondente exatamente ao meio da sigmoide, onde as variações de frequência por mmHg são máximas naquele grupo de animais. Os valores médios e respectivos erros padrões das médias são descritos no texto, em resultados. * $p < 0,05$ vsWistar; # $p < 0,05$ vs SHR.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos dos grãos de Kefir no controle autonômico cardiovascular e sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR. Foi testada a hipótese de que a administração crônica do probiótico nestes animais teria efeitos benéficos, dentre os quais se destacaria a sua ação de melhora da disfunção barorreflexa.

Há evidências de que o consumo de produtos lácteos fermentados com compostos bioativos, como o *Lactobacillus helveticus* durante 8 semanas, atenua a pressão arterial elevada no modelo SHR (Jakala *et al.*, 2009), o que foi posteriormente confirmado por outros autores (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012; Gómez-Guzmán *et al.*, 2015) e mais recentemente por nosso laboratório (Frigues *et al.*, 2015). Tais efeitos benéficos sobre a hipertensão arterial foram explicados pela presença de bactérias e fungos nos grãos de Kefir, por haver nele uma relação simbiótica (Lu *et al.*, 2014). Os dados do presente estudo, tratando ratos SHR por 60 dias com *Kefir*, confirmam este benefício anti-hipertensivo deste probiótico.

O resultado mais marcante foi a confirmação da nossa hipótese de que o Kefir também seria capaz de melhorar o ganho do barorreflexo neste modelo de hipertensão experimental. Estes dados na presente dissertação fazem parte do conjunto de dados recentemente por nós publicados (Klippe *et al.* 2016, anexo a esta dissertação), o primeiro trabalho a descrever estes efeitos do Kefir. Como consta no artigo em anexo, estes animais SHR quando tratados com Kefir por 60 dias, mas não durante menos tempo, apresentam uma melhora no balanceamento do tono vagal versus tono simpático de controle da função cardíaca. Isto é, o tono vagal diminuído e simpático aumentado do animal SHR é significativamente atenuado. Isto atesta os vários efeitos benéficos desta terapia nutricional à base de leite fermentado na prática médica de diversas condições cardiovasculares. Tais efeitos benéficos poderiam ser explicados pela presença de bactérias e leveduras que partilham uma relação simbiótica nos grãos de Kefir (Lu *et al.*, 2014) e resultam na produção de elementos biogênicos (Hamet *et al.*, 2013).

Na população em geral, a atividade autonômica mostra um ritmo circadiano com a prevalência do tônus simpático durante o dia e nas primeiras horas

ao acordar e um aumento relativo do tônus simpático durante a noite (Bernardi *et al.*, 1992). A disfunção autonômica cardíaca ocorre em diversas doenças que diretamente ou indiretamente afetam o coração, aumentando o risco e o grau de morbidade e mortalidade. É definida como um desequilíbrio entre a atividade simpática e vagal associada com disfunção do barorreflexo e aumento da variabilidade da pressão arterial (Blanco *et al.*, 2015; Massonet *et al.*, 2015; Abboud, 2010).

Entre os sistemas neurais que controlam a função cardiovascular, o barorreflexo é um mecanismo neural conhecido por ter um papel importante na regulação da função cardiovascular, diminuindo as flutuações agudas na pressão arterial através de variações na frequência cardíaca e na resistência vascular. É bem conhecido que a elevação da pressão arterial persistente altera a sensibilidade dos barorreceptores, contribuindo para o aumento da variabilidade da PA, e induz danos em órgãos (PeottaV A.*et al.*, 2007; Moreira, 2013). O barorreflexo é o principal mecanismo neural de ajustes rápidos da pressão arterial, e pode estar alterado diante de algumas fisiopatologias como, por exemplo, a hipertensão arterial e a aterosclerose (Moysés *et al.*, 1994b; Peotta*et al.*, 2007; Vasquez *et al.*, 2012). Vários estudos têm sugerido que a diminuição da atividade do barorreflexo é um forte preditor para várias doenças e mortalidade cardíaca (La Rovere*et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2012).

Na publicação em anexo a esta dissertação está demonstrada por nosso laboratório a avaliação da sensibilidade do barorreflexo no animal SHR por abordagem farmacológica em animais acordados. O nosso objetivo naquele estudo foi avaliar o barorreflexo, por aumento e diminuição da pressão arterial e plotando a consequente bradicardia e taquicardia reflexas no pico de 25 mmHg de alteração pressórica, através da fenilefrina e do nitroprussiato de sódio. Para tanto, a análise foi realizada com uma simples regressão linear, determinando o ganho exatamente no pico de 25 mmHg. No presente estudo, fizemos uma abordagem mais ampla sobre a função barorreflexa neste modelo de hipertensão e avaliamos a ação benéfica do Kefir sobre a mesma.

A importância da metodologia adotada no presente protocolo de avaliação do barorreflexo é de que as curvas sigmoidais ajustadas e associadas com o cálculo

da primeira derivada da função logística têm vários parâmetros que podem ser avaliados, os quais são utilizados para construção das barocurvas. A atenuação do platô superior e inferior observado nas curvas sigmoidais dos SHR representam um prejuízo tanto na resposta taquicárdica reflexa como na resposta bradicárdica reflexa. Estes dados corroboram dados anteriores de nosso grupo neste (Schenberger *et al.*, 1995) e noutros modelos de hipertensão experimental (Moyses *et al.*, 1994a, 1994b, Peotta *et al.*, 2007). No trabalho publicado (Anexo), ficou claro que o prejuízo do barorreflexo está centrado principalmente no prejuízo do componente vagal cardíaco, embora o componente simpático também apresente menor poder de ação frente a quedas na pressão arterial. Tem sido visto que um desequilíbrio no balanço entre tônus vagal e simpático podem conduzir a um prejuízo na sensibilidade dos barorreceptores, como tem sido demonstrado em vários modelos de hipertensão arterial (Campagnaro *et al.*, 2012; Moysés *et al.*, 1994a), incluindo o SHR (Monteiro *et al.*, 2012; Dias da Silva Valdo *et al.*, 2002). Portanto, o presente estudo corrobora achados anteriores de nosso laboratório (Campagnaro *et al.*, 2012; Moysés *et al.*, 1994a) e de outros (Braga *et al.*, 2008) em diferentes modelos de hipertensão experimental.

6 CONCLUSÃO

No presente protocolo experimental ficou claro que o Kefir administrado por 60 dias proporcionou uma atenuação no prejuízo da sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR. Somos os primeiros a demonstrar, pelo método de barocurva, que o tratamento com Kefir por 60 dias melhora o prejuízo da sensibilidade do barorreflexo observado em animais SHR. Como a taquicardia reflexa é consequência da ativação do componente simpático cardíaco com simultânea retirada da atividade parassimpática e como o Kefir melhora o balanço simpático/vagal, os animais SHR tratados com Kefir mostraram barocurvas significativamente melhoradas na magnitude das respostas cronotrópicas reflexas frente a aumentos e quedas da pressão arterial.

Portanto, em adição a outras terapias não farmacológicas, tais como o exercício físico (Ceroniet *al.*, 2009), a administração crônica do probiótico nutricional Kefir parece ter ações benéficas por meio da restauração do principal sistema de controle neural da pressão arterial.

REFERÊNCIAS

- Abboud F. M. The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: The wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010; 298 (6): R1449-1467.
- Abboud F. M., Harwani S. C., Chapleau M. W. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2012; 59 (4): 755-762.
- Anadón A., Martínez M. A., Ares I., Ramos E., Martínez-Larrañaga M. R., Contreras M. M., Ramos M., Recio I. Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90-94) and (143-149) from α_{s1} -casein. *Food and chemical toxicology*. 2010; 48: 1836-1845.
- Barbosa Neto O., Abate D. T., Marocolo Júnior M., Mota G. R., Orsatti F. L., Rossi e Silva R. C., Reis M. A., da Silva V. J. Exercise training improves cardiovascular autonomic activity and attenuates renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Sports Science & Medicine*. 2013; 12 (1): 52-59.
- Bernardi L., Ricordi L., Lazzari P., Soldá P., Calciati A., Ferrari M. R., Vandeia I., Finardi G., Fratino P. Impaired circadian modulation of sumpathovagal activity in diabetes: A possible explanation for altered temporal onset of cardiovascular disease. *Circulation*. 1992; 86: 1443-1452.
- Blanco J.H, Gastaldi A.C, Gardim C.B, Araujo J.E, Simões M.V, Oliveira L.F, Carvalho E.E, Souza H.C. Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. *AutonNeurosci*. 2015 Dec;193:97-103. doi: 10.1016/j.autneu.2015.09.002.
- Braga V.A., Burmeister M.A., Sharma R.V., Davisson R.L. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2008; 295 (4): R1168-R1174.
- Campagnaro B. P., Gava A. L., Meyrelles S. S., Vasquez E. C. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *International journal of hypertension*. 2012; 2012: 968123.
- Ceroni A., Chaar L. J., Bombein R. L., Michelini L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*. 2009; 94 (6): 630-640.

Chapleau M. W., Cunningham J. T., Sullivan M. J., Wachtel R. E., Abboud F. M. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension*. 1995; 26 (2): 341-347.

Dias da Silva VJ, Gneccchi-Ruscione T, Lavelli B, Bellina V, Manzella D, Porta A, Malliani A, Montano N. Opposite effects of iv amiodarone on cardiovascular vagal and sympathetic efferent activities in rats. *Am J PhysiolRegulIntegrCompPhysiol*. 2002 Aug;283(2):R543-8.

Duncan B., Schmidt M. I.,Giugliani E. R. J. Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseada em evidências. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Friques A. G., Arpini C. M., Kalil I. C., Gava A.L., Leal M. A., Porto M. L., Nogueira B. V., Dias A. T., Andrade T.U., Pereira T. M., Meyrelles S. S., Campagnaro B. P., Vasquez E. C. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*. 2015; 13 (1): 390.

Gómez-Guzmán M., Toral M., Romero M., Jiménez R., Galindo P., Sánchez M., Zarzuelo M. J., Olivares M., Gálvez J., Duarte J. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015; 59 (11): 2326-2336.

Hamet M. F., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van Hoorde K., Garrote G. L., Huys G., Vandamme P., Abraham A. G. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranoferiensis* microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiology*. 2013; 36 (2): 327–334.

Hayward L. F., Castellanos M., Noah C. Cardiorespiratory variability following repeat acute hypoxia in the conscious SHR versus two normotensive rat strains. *AutonomicNeuroscience: basic&clinical*. 2012; 171 (1-2): 58-65.

Irigoyen M. C, Consolim-Colombo F. M., Krieger E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *RevistaBrasileira de Hipertensão*.2001; 8: 55-62.

Jakala P., Pere E., Lehtinen R., Turpeinen A., Korpela R., Vapaatalo H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009; 60 (4): 11–20.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365: 217-223.

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TM, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Effects of

Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Physiol.* 2016 Jun 7;7:211. doi: 10.3389/fphys.2016.00211.

La Rovere M. T., Pinna G. D., Maestri R., Sleight P. Clinical value of baroreflex sensitivity. *Netherlands Heart Journal.*2013; 21: 61-63.

Leite AM, Leite DC, Del Aguila EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MA, Silva JT, Paschoalin VM. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *J Dairy Sci.* 2013 Jul;96(7):4149-59. doi: 10.3168/jds.2012-6263.

Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N., Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología.*2006; 23: 67-74.

Lu M., Wang X., Sun G., Qin B., Xiao J., Yan S., Pan Y., Wang Y. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLoS One.* 2014; 9 (6): e101387.

Masson G. S., Nair A. R., Soares P. P. S., Michelini L. C., Francis J. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology.* 2015; 309 (7): H1115-H1122.

Meyrelles SS, Mill JG, Cabral AM, Vasquez EC. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. *J Auton Nerv Syst.* 1996 Sep 12;60(3):163-8. PubMed PMID: 8912266

Monteiro M. M., França-Silva M. S., Alves N. F., Porpino S. K., Braga V. A. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules.* 2012; 17 (11): 12997-3008.

Moreira E. D., Mostarda C. T., Moraes-Silva I. C., Ferreira J. B., Santos F., Lacchini S., De Angelis K., Rodrigues B., Irigoyen M. C. Effect of simvastatin in the autonomic system is dependent on the increased gain/sensitivity of the baroreceptors. *Physiological Reports.* 2013; 1(3): e00045.

Moyses M. R., Cabral A. M., Marcal D., Vasquez E. C. Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 1994a; 27 (6): 1419–1424.

Moyses M.R., Cabral, A.M., Marçal, D., Vasquez.E.C. Time course of changes in sigmoidal-fitting baroreceptor curve in one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension,* 1994b; 23 (Supl. 1), 187-192,

Nielsen B., Gürakan G. C., Ünlü G. Kefir: A multifaceted fermented dairy product. *Probiotics & Antimicrobial Proteins.*2014; 6: 123-135.

Peotta V. A., Gava A. L., Vasquez E. C., Meyrelles S. S. Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007; 85 (8): 761–766.

Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A. F., Astiazaran-García H., Vallejo-Cordoba B. Hypotensive and heart rate lowering effects in rats receiving milk fermented by specific lactococcuslactis strains. *British Journal of Nutrition*. 2012; 109: 927-833.

Sakar S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*. 2007; 109 (4): 280-290.

Schenberg L.C., Brandão C.A., Vasquez E.C. Role of periaqueductal gray matter in hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995 Dec; 26(6 Pt 2): 1125-8. PubMed PMID: 7498981

Silva G. J., Ushizima M. R., Lessa P. S., Cardoso L., Drager L. F., Atala M. M., Consolim-Colombo F. M., Lopes H. F., Cestari I. A., Krieger J. E., Krieger E. M. Critical analysis of autoregressive and fast Fourier transform markers of cardiovascular variability in rats and humans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009; 42 (4): 386-96.

Silva I. C. M. Efeitos do treinamento físico aeróbio nas adaptações hemodinâmicas, autonômicas e morfofuncionais cardíacas da hipertensão espontânea: influência do barorreflexo. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

Sociedade Brasileira de Hipertensão. Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão. Disponível em: *Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão*. 2010, vol. 7 (3); 86-89.

Su D.F., Miao C.Y. Blood pressure variability and organ damage. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2001; 28: 709-715.

Vasquez E. C., Meyrelles S. S., Mauad H., Cabral A. M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997; 30 (4): 521-32.

Vasquez E. C., Peotta V. A., Meyrelles S. S. Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012; 29 (5-6): 635-46.

WHO, World Health Organization. 2013. A global brief on hypertension. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1 Acesso 05/01/2016.

Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Guldager H.S., Tamine A.Y. Production of kefir, koumiss and other related products. Ucrânia: Blackwell Science Ltd., 2006. Cap. 8, p. 174-2016.

ANEXO



Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats

Brunella F. Klippel^{1†}, Licia B. Duemke^{2†}, Marcos A. Leal¹, Andreia G. F. Friques², Eduardo M. Dantas³, Rodolfo F. Dalvi⁴, Agata L. Gava¹, Thiago M. C. Pereira^{2,4}, Tadeu U. Andrade², Silvana S. Meyrelles¹, Bianca P. Campagnaro^{2*} and Elisardo C. Vasquez^{1,2}

OPEN ACCESS

Edited by:

Valdir Andrade Braga,
Federal University of Paraíba, Brazil

Reviewed by:

Bruce N. Van Vliet,
Memorial University of Newfoundland,
Canada
Joao Henrique da Costa Silva,
Federal University of Pernambuco,
Brazil
Valter Joviniano Santana Filho,
Federal University of Sergipe, Brazil

*Correspondence:

Bianca P. Campagnaro
biancacampagnaro@yahoo.com.br

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 07 April 2016

Accepted: 22 May 2016

Published: 07 June 2016

Citation:

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AGF, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TMC, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP and Vasquez EC (2016) Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front. Physiol.* 7:211. doi: 10.3389/fphys.2016.00211

¹ Laboratory of Translational Physiology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil, ² Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, Brazil, ³ Department of Physiology, Federal University of Vale São Francisco, Petrolina, Brazil, ⁴ Department of Biochemistry, Institute of Education, Science and Technology, Vila Velha, Brazil

Aims: It has been previously shown that the probiotic kefir (a symbiotic matrix containing acid bacteria and yeasts) attenuated the hypertension and the endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats (SHR). In the present study, the effect of chronic administration of kefir on the cardiac autonomic control of heart rate (HR) and baroreflex sensitivity (BRS) in SHR was evaluated.

Methods: SHR were treated with kefir (0.3 mL/100 g body weight) for 60 days and compared with non-treated SHR and with normotensive Wistar-Kyoto rats. Cardiac autonomic vagal (VT) and sympathetic (ST) tones were estimated through the blockade of the cardiac muscarinic receptors (methylatropine) and the blockade of β_1 -adrenoceptor (atenolol). The BRS was evaluated by the tachycardia and bradycardia responses to vasoactive drug-induced decreases and increases in arterial blood pressure (BP), respectively. Additionally, spontaneous BRS was estimated by autoregressive spectral analysis.

Results: Kefir-treated SHR exhibited significant attenuation of basal BP, HR, and cardiac hypertrophy compared to non-treated SHR (12, 13, and 21%, respectively). Cardiac VT and ST were significantly altered in the SHR (~40 and ~90 bpm) compared with Wistar rats (~120 and ~30 bpm) and were partially recovered in SHR-kefir (~90 and ~25 bpm). SHR exhibited an impaired bradycardic BRS (~50%) compared with Wistar rats, which was reduced to ~40% in the kefir-treated SHR and abolished by methylatropine in all groups. SHR also exhibited a significant impairment of the tachycardic BRS (~23%) compared with Wistar rats and this difference was reduced to 8% in the SHR-kefir. Under the action of atenolol the residual reflex tachycardia was smaller in SHR than in Wistar rats and kefir attenuated this abnormality. Spectral analysis revealed increased low frequency components of BP (~3.5-fold) and pulse interval (~2-fold) compared with Wistar rats and these differences were reduced by kefir-treatment to ~1.6- and ~1.5-fold,

respectively. Spectral analysis also showed an impairment of spontaneous BRS in SHR, but kefir-treatment caused only a tendency to reverse this result.

Conclusions: The novelty of this study is that daily chronic consumption of a low dose of kefir reduced the impairment of the cardiac autonomic control of HR and of the impaired BRS in SHR.

Keywords: probiotic, hypertension, sympathetic tone, vagal tone, tachycardia, bradycardia

INTRODUCTION

In recent years, the fermented milks containing lactic acid bacteria, the so-called probiotics, including kefir, emerged as an alternative therapy due to the growing interest for well-being and healthy lifestyle. Experimental and clinical studies have demonstrated the beneficial effects of functional foods in cardiovascular diseases (Jakala et al., 2009; Turpeinen et al., 2011; Monteiro et al., 2012; Astrup, 2014; Friques et al., 2015).

The spontaneously hypertensive rat (SHR) have been used as an important tool to understanding cardiovascular dysfunctions, such as high blood pressure (BP), endothelial injury and abnormal neural control of the cardiovascular system (Vasquez et al., 1997; Abreu et al., 1998; Blanco et al., 2015; Friques et al., 2015). In recent years, this hypertensive animal emerged as a promising model to identify alternative or non-pharmacological agents for prevention/treatment of cardiovascular disease because it develops essential hypertension (Ceroni et al., 2009; Monteiro et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2013; Friques et al., 2015). In this regard, our group has recently demonstrated the beneficial effects of kefir on BP and endothelial dysfunction in chronically treated SHR rats (Friques et al., 2015). The mechanisms of those actions included a partial correction of the reactive oxygen species/nitric oxide imbalance and the partial restoring of the endothelial architecture due to endothelial progenitor cells attraction.

Another relevant characteristic of the SHR is an abnormal autonomic nervous control of cardiac activity (Ceroni et al., 2009; Monteiro et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2013), which is closely correlated with end-organ damage (Su and Miao, 2005; Abboud, 2010; Abboud et al., 2012). The influence of the autonomic nervous system on the heart rate (HR) and blood pressure (BP) in SHR has clearly been demonstrated (Schenberg et al., 1995; Vasquez et al., 1997; Abreu et al., 1998; Dias da Silva et al., 2002; Silva et al., 2009; Abboud, 2010) and appears to be frequency-dependent (Dias da Silva et al., 2002; Ceroni et al., 2009; Silva et al., 2009). Despite some discrepancies, multiple studies have demonstrated a decreased cardiac parasympathetic (vagal) tone and an increased cardiac and vessel sympathetic tone in SHR when compared with normotensive Wistar rats (Ceroni et al., 2009; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2013). However, a possible beneficial action of the probiotic kefir on the cardiac dysautonomia in hypertensive rats has not yet been evaluated.

The baroreflex sensitivity, which is a marker of the capability of reflexes to increase vagal activity and to decrease sympathetic activity in response to a sudden increase in BP, is diminished in experimental models of essential (Barbosa Neto et al., 2013)

and secondary (Moyses et al., 1994; Campagnaro et al., 2012) hypertension, as well as in cardiovascular related diseases, such as atherosclerosis (Vasquez et al., 2012). This reflex has classically been evaluated through invasive approaches using vasoconstrictor and vasodilator agents (Moyses et al., 1994; Campagnaro et al., 2012) and later through procedures using spectral analysis (Dias da Silva et al., 2002; Chapleau and Sabharwal, 2011).

The concept that the BP is affected by baroreflex-mediated changes in autonomic nerve activity in the heart and systemic vasculature, highlights the importance of studying the effects of alternative functional foods therapies on the autonomic and reflex control of the cardiovascular system. Therefore, the present study was designed to test the hypothesis that chronic administration of kefir can ameliorate the abnormal autonomic control of HR and the impaired baroreflex sensitivity in SHR rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The present study was performed in male 4-month-old SHR and in age-matched Wistar-Kyoto rats obtained from the Vila Velha University animal care and that were maintained in the animal care facility of the Federal University of Espirito Santo, Brazil. The rats were housed in individual acclimatized plastic cages with a controlled temperature (22–23°C), light-dark cycle (12:12-h), and were fed with a standard rat chow and water *ad libitum*. The study protocols were previously approved by the Institutional Committee on Animal Care (CEUA-UFES, Protocol #040/2014). All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals as recommended by the National Institutes of Health (NIH).

Kefir Preparation, Identification, and Administration

The identification, preparation and administration of kefir were performed as previously described (Friques et al., 2015). Briefly, kefir was obtained from the fermentation of the grains in whole milk. The kefir beverage was prepared by adding kefir grain to pasteurized whole milk in a ratio of 4% (w/v).

The treatment of the animals was started at the age of 4-month-old and lasted 60 days. One group of animals was treated with kefir (0.3 mL/100 g body weight, by gavage, SHR-kefir) for 60 days. Another group of SHR was administered whole milk (0.3 mL, pH adjusted to 4.5, SHR) for 60 days for use as the hypertensive controls. The rationale for using 0.3 mL/100 g body weight was based on the dose translation from human to animal studies by a simple method using the body surface

area normalization and that dose is compatible with that used in human beings. The Wistar rats were administered whole milk for 60 days and were used as normotensive control groups. The reason for treating the animals with kefir for 60 days was based on a previous study from our group (Friques et al., 2015), demonstrating that the treatment for less than 60 days had no effect on cardiovascular parameters in SHR.

Instrumentation for Hemodynamic Measurements

After 60 days of kefir administration, the animals were intraperitoneally anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (91 + 9.1 mg/kg) and a polyethylene catheter (PE 50) was positioned into the femoral vein for injection of drugs and another into the inferior aorta for measurement of pulsatile pressure, mean BP and HR 48 h later using a data-acquisition system (Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA) in unrestrained animals.

At the end of the evaluation of hemodynamic parameters, the animals were euthanized by an over-dose of thiopental (100 mg/kg) and the hearts were excised. The right and the left ventricles, including the interventricular septum, were dissected from the remaining cardiac tissues. The tibia bone was also dissected and its length was measured. To evaluate the extent of cardiac hypertrophy for each animal the left ventricle weight was normalized by the animal's body weight and tibia length.

Evaluation of the Cardiac Autonomic Tones

Cardiac autonomic tones were estimated through selective pharmacological blockers of the muscarinic receptors (methylatropine) and the β_1 -adrenergic receptors (atenolol) in conscious animals, based on previous studies from our laboratory and from others (Chapleau and Sabharwal, 2011; Campagnaro et al., 2012). As shown in the scheme in **Figure 3** (top), the cardiac parasympathetic tone was estimated by the change in basal HR 15 min after a single injection of methylatropine (1 mg/kg, i.v.), which reaches a plateau effect at approximately this time and lasts for ~30 min. Immediately afterwards, they were injected with atenolol (1 mg/kg, i.v.), which also reached a maximum effect 15 min later, and this value was considered the intrinsic (pacemaker) HR. the next day, the sequence of the injections was the opposite, and the cardiac sympathetic tone was estimated by the change in the basal HR 15 min after atenolol, and the intrinsic HR was estimated 15 min under the double blockade.

Pharmacological Baroreflex Sensitivity

The baroreflex control of arterial pressure was evaluated in conscious animals by measuring the tachycardia and bradycardia in response to an equivalent increase in arterial BP in each of the three groups of conscious animals. Based on previous studies from our laboratory demonstrating that the major sensitivity of the baroreflex is at changes in arterial BP close to the resting values and that changes in BP higher than 40 mmHg could elicit complex humoral mechanisms, we decided to challenge the baroreflex with sudden increase and decrease in BP of ~25 mmHg (Schenberg et al., 1995; Gava et al., 2004). These

changes in BP were elicited by a single bolus injection of phenylephrine (1 μ g/kg) and sodium nitroprusside (1 μ g/kg), respectively.

The relative contribution of the cardiac parasympathetic and sympathetic nerves was assessed by increase or decrease in HR in response to a sudden decrease or increase in BP, under the blockade of cardiac muscarinic receptors with methylatropine (1 mg/kg, i.v.) on day one and the blockade of the cardiac β_1 -adrenoceptors with atenolol (1 mg/kg, i.v.) on the following day.

Spectral Analysis

An aim of this protocol was to characterize patterns of autonomic control in SHR and normotensive Wistar rats by power spectral analysis of pulse interval (PI) variability and BP variability as previously described (Dantas et al., 2012). Power spectra analysis was performed using a Matlab-customized software validated against the software developed by A. Porta in Italy (Linear Analysis version 8.3, University of Milan, Italy). Pulse intervals from systolic arterial pressure were obtained from 30 min of continuous BP records in conscious animals. A parametric method based on autoregressive model of spectral estimation was performed for systolic arterial BP and PI analysis. The oscillatory components in the rat were quantified as low frequency (LF: 0.2–0.8 Hz) mainly corresponding to sympathetic activity and high frequency (HF: 0.8–2.8 Hz) corresponding to vagal activity (influenced by respiration; Silva et al., 2009; Dantas et al., 2013; Quagliotto et al., 2015).

The estimation of spontaneous baroreflex sensitivity was obtained by measuring oscillations in BP and PI in the LF range using spectral analysis. The baroreceptor sensitivity value was provided by α -LF index, which was calculated as the square root of the ratio between the absolute power of PI-LF/BP-LF, expressed in ms/mmHg. The oscillations in BP and PI needed to be coherent (coherence²), with a coherence higher than 0.5, and a negative phase difference was required between the two variables, as recently reviewed (Chapleau and Sabharwal, 2011).

Statistical Analysis

The values are expressed as means $\pm$ SEM. First, a D'Agostino-Pearson omnibus normality test was performed to verify if that the values came from a Gaussian distribution. All data Statistical comparisons between the different groups were performed by a randomized one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's *post hoc* test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 6.07 (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Microbiological Analysis of Kefir

The microbiological analysis of random samples of grains used in the present study, showed a dominant microflora of kefir, which included various bacteria that are known to have beneficial effect (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter sp.*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc spp.*), as well as *Lactobacillus*

kefiranoferiens, and yeasts (*Candida famata*, *Candida krusei*, and *Candida kefir*). The global counting of microorganisms in the samples of milk fermented with kefir grains was 7.6×10^7 units forming colonies (UFC)/mL. Fermenter microorganisms averaged 6.6×10^7 UFC/mL. *Lactobacillus sp* and *Lactococcus sp* represent the largest and most commonly identified lactic acid bacteria isolates. The average number of acetic and fermenter bacterias was 2.0×10^6 and 6.6×10^7 UFC/mL, respectively and the average number of yeasts was $\sim 4.1 \times 10^5$ UFC/mL.

Basal BP and HR in Conscious Animals

As expected, the conscious SHR exhibited significant high levels of systolic, diastolic and mean BP (204 ± 8 , 144 ± 4 , and 167 ± 4 mmHg, respectively, $p < 0.05$) and resting HR (355 ± 9 bpm, $p < 0.05$) compared with the Wistar rats (140 ± 8 , 88 ± 2 , and 104 ± 2 mmHg, respectively, and 328 ± 12 bpm; **Figure 1**). Administration of kefir for 60 days caused a significant attenuation of systolic, diastolic and mean BP which was reduced to 169 ± 8 , 116 ± 6 , and 134 ± 6 mmHg, respectively, and on HR, which was reduced to 322 ± 11 bpm.

Body Weight and Cardiac Hypertrophy

Administration of kefir did not cause effect on the consumption of water and food. At the moment of the evaluation of the outcomes (i.e., 60 days after kefir administration), body weight was significantly diminished ($\sim 32\%$, $p < 0.05$) in non-treated and kefir-treated SHR than in the age-matched Wistar rats (328 ± 3 vs. 480 ± 8 g, $p < 0.05$). Left and right ventricular cardiac mass were significantly ($p < 0.05$) greater in non-treated SHR (893 ± 30 mg or 13% and 386 ± 24 mg or 40% , respectively) than in normotensive Wistar rats (787 ± 29 and 274 ± 20 mg, respectively). Kefir administration for 60 days caused a significant and complete normalization in the left ventricle mass (785 ± 25 mg or -13%) and a significant attenuation of the right ventricle mass (352 ± 37 mg or -10%). The normalization of the left ventricle weight by the body weight and tibia length revealed left ventricular hypertrophy in the non-treated SHR group (2.7 ± 0.3 mg/g and 22 ± 1.4 mg/mm, respectively, $p < 0.05$) compared with the values observed in the Wistar group (1.6 ± 0.4 mg/g and 17 ± 1.4 mg/mm, respectively; **Figure 2**). The treatment of SHR with kefir for 60 days had no significant effect on the left ventricle hypertrophy when the ventricle chamber weight was normalized by the body weight (2.4 ± 0.2 mg/g and 19 ± 1.2 mg/mm, respectively, $p < 0.05$). However, kefir administration reduced the left ventricle hypertrophy, when the ventricle chamber weight was normalized by the tibia length, which was 41 ± 0.3 mm in both SHR and SHR-kefir vs. 46 ± 0.3 mm in Wistar rats, $p < 0.05$).

Cardiac Autonomic Tone

The protocol used to assess the cardiac parasympathetic (vagal) and sympathetic tones is schematically shown in **Figure 3B**. **Figure 3A** shows representative recordings of arterial BP and HR and **Table 1** and **Figure 3C** show the average data. In the normotensive Wistar group, the blockade of muscarinic receptors with methylatropine resulted in a significant increase in basal HR, from 336 ± 15 to 455 ± 11 bpm, indicating a

vagal tone of $+120$ bpm (**Figure 3C**). In the non-treated SHR group, the change in basal HR was from 365 ± 12 to 406 ± 17 bpm (approx. $+40$ bpm), i.e., a significant decreased vagal tone compared with Wistar rats (**Table 1** and **Figure 3C**). In the SHR group treated with kefir for 60 days, methylatropine caused a significant change from 319 ± 15 to 410 ± 12 bpm (**Table 1** and **Figure 3C**), indicating a partial recovery of the vagal tone (approximately $+90$ bpm, $p < 0.05$; **Figure 3C**).

The effects of the blockade of β_1 -adrenoceptors with atenolol, which was used to evaluate the cardiac sympathetic tone, is illustrated in **Figure 3A** and the average data are shown in **Table 1** and **Figure 3C**. The basal HR was reduced to 306 ± 14 bpm (approximately -30 bpm) in the Wistar group. In the non-treated SHR the magnitude of reduction in basal HR was significantly higher (277 ± 16 bpm, approximately -90 bpm, $p < 0.05$), but the treatment of SHR with kefir for 60 days abolished this difference between strains; the basal HR was reduced to 294 ± 15 bpm (approximately -25 bpm).

The intrinsic HR, which was considered as the resting HR under the double blockade with methylatropine and atenolol (**Table 1**), was similar in the three groups of animals (**Figure 3C**).

Classical Pharmacological Analysis of the Baroreflex Function

The effect of kefir administration on the baroreflex sensitivity as well as the relative contribution of the cardiac vagal and sympathetic components in conscious SHR are shown in **Figures 4, 5**. As expected and illustrated in **Figure 4**, when the baroreflex was challenged by moderate phenylephrine-induced increases in arterial BP (approx. 25 mmHg), the SHR group showed a significantly decrease in the reflex bradycardia ($\sim 50\%$, $p < 0.05$), when compared with the Wistar group and, consequently, a significant reduction in the baroreflex gain ($\sim 50\%$, $p < 0.05$) was observed (**Figure 4B**). When SHRs were treated with kefir for 60 days, phenylephrine-induced matched-increases in BP resulted in mild, but significant, improvement of the reflex bradycardia ($\sim 40\%$, $p < 0.05$) and consequently also the baroreflex gain ($\sim 35\%$, $p < 0.05$), respectively. The blockade of cardiac muscarinic receptors with methylatropine basically abolished the reflex bradycardia and the baroreflex gain in a similar way in the three groups. The disappearance of intergroup

TABLE 1 | Effects of methylatropine and atenolol on resting heart rate in conscious Wistar, non-treated SHR and SHR treated for 60 days with kefir.

Heart Rate (bpm) Measurement	Groups		
	Wistar (12)	SHR (12)	SHR kefir (11)
Basal	336 ± 15	$365 \pm 12^*$	$319 \pm 15^\#$
Methylatropine effect (muscarinic blockade)	455 ± 11	$406 \pm 17^*$	$410 \pm 12^*$
Atenolol effect (β -adrenoceptor blockade)	306 ± 14	$277 \pm 16^*$	294 ± 15
Double blockade effect	360 ± 11	330 ± 16	340 ± 14

Values are means $\pm$ SEM. $^*p < 0.05$ vs. Wistar group; $^\#p < 0.05$ vs. SHR group.

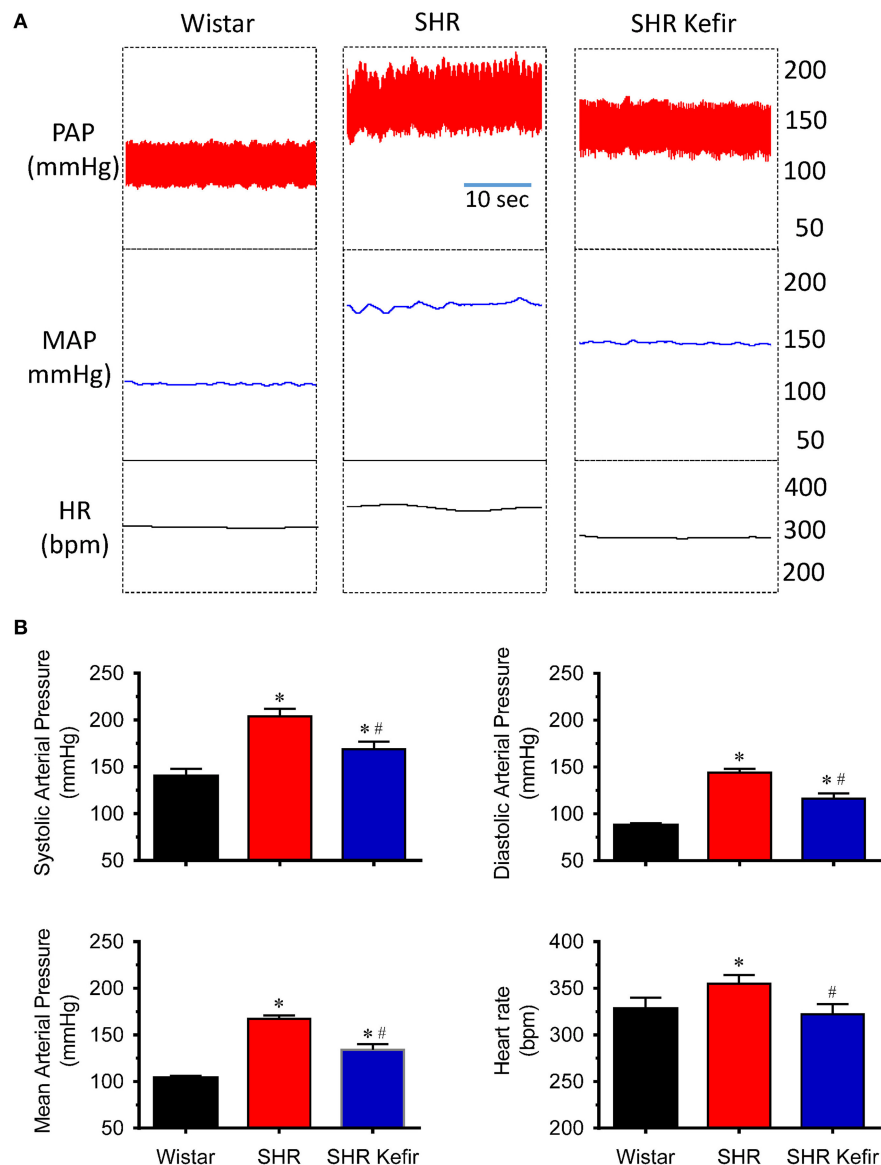


FIGURE 1 | Effects of chronic administration of kefir on the pulsatile (PAP) and mean (MAP) arterial pressure and heart rate (HR) in conscious spontaneously hypertensive rats (SHR). Top panels (A) show representative recordings of PAP, MAP, and HR. Bar graphs (B) values are means $\pm$ SEM ($n = 12$ per group). * $p < 0.05$ compared to Wistar group, # $p < 0.05$ compared to non-treated SHR (one-way ANOVA).

differences in the reflex bradycardia after methylatropine indicate that they were due to the vagal component of the baroreflex.

Figures 5A,B show representative recordings and average data of the baroreflex when it was challenged by a moderate dose of sodium nitroprusside. This vasodilator induced falls in arterial BP of approximately 25 mmHg in all groups of animals. The SHR group showed a significantly lower reflex tachycardia (23%, $p < 0.05$), when compared with the Wistar group and, consequently, a significant reduction in the baroreflex gain (23%, $p < 0.05$) was observed (**Figure 5B**). When SHRs were treated with kefir for 60 days, these differences were reduced to $\sim 8\%$ and $\sim 12\%$, despite the same size of

nitroprusside-induced reductions of BP. The blockade of cardiac β_1 -adrenoceptors with atenolol reduced (but not abolished) the reflex tachycardia in Wistar, SHR and SHR-kefir. The values reached were significantly lower in SHR and significantly recovered in the SHR treated with kefir for 60 days (14 ± 2.4 , 7 ± 2.8 , and 12 ± 2.4 bpm, respectively). A similar effect was observed in the baroreflex gain (0.53 ± 0.11 , 0.26 ± 0.10 , and 0.46 ± 0.12 bpm/mmHg, respectively; **Figure 5**). The lower reflex tachycardia and baroreflex gain in SHR under the atenolol effect indicate that part of the reflex tachycardia may be due to a withdrawal of the vagal activity, which was reduced in the SHR.

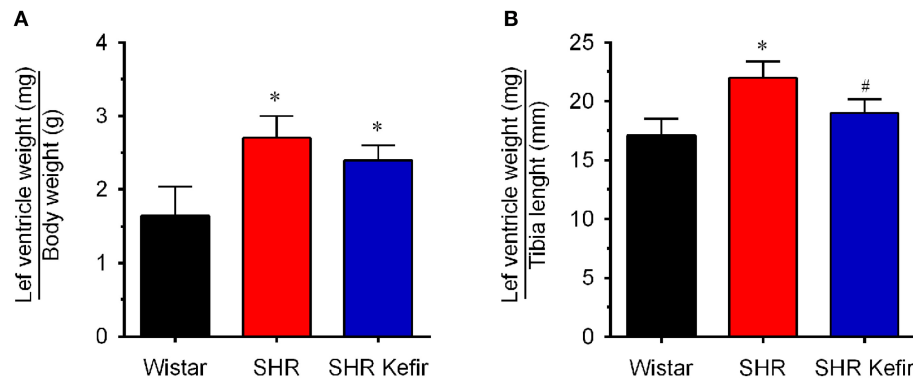


FIGURE 2 | Effects of chronic administration of kefir on the cardiac hypertrophy in SHR based on the left ventricular weight normalized by the body weight (A: left graph) and tibia length (B: right graph). Values are means $\pm$ SEM ($n = 8$ per group). * $p < 0.05$ compared to Wistar group, # $p < 0.05$ compared to non-treated SHR (one-way ANOVA).

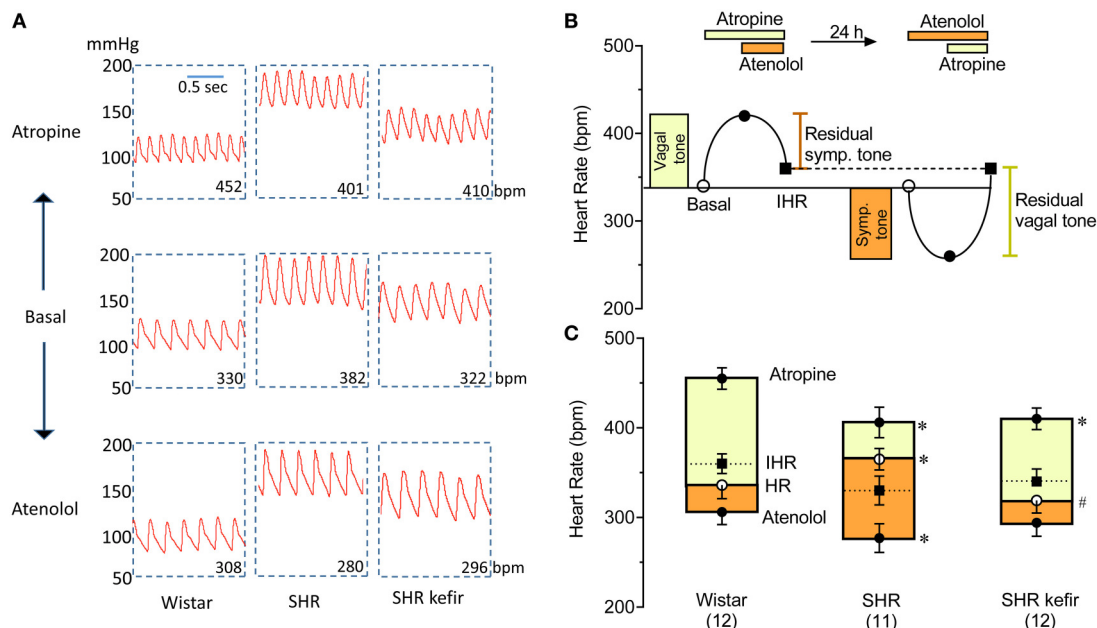


FIGURE 3 | Effects of chronic administration of kefir on the cardiac autonomic tones in SHR. (A): typical recordings of pulsatile blood pressure before and respective chronotropic changes after the blockade of muscarinic receptors with methylatropine (1st day) and after the blockade of β -adrenoceptors (2nd day). **(B):** scheme showing the estimation of the vagal tone through methylatropine and the sympathetic tone through atenolol and the pacemaker or intrinsic heart rate (IHR), which was determined by the double blockade of vagal and sympathetic activity. **(C):** mean values $\pm$ SEM ($n = 11$ to 12 per group) used for determination of each parameter. * $p < 0.05$ vs. Wistar group; # $p < 0.05$ vs. non-treated SHR. **(B):** upper panel was redrawn from Chapleau and Sabharwal (2011).

Spectral Analysis

Spectral analysis was applied to study the effect of kefir on the PI and BP variability in SHR-kefir compared to non-treated SHR and normotensive Wistar rats. The data showed a significantly higher PI variance in non-treated SHR ($730 \pm 150 \text{ ms}^2$, $p < 0.05$) when compared with SHR-kefir ($478 \pm 80 \text{ ms}^2$) and with normotensive Wistar rats ($247 \pm 46 \text{ ms}^2$). The power spectral analysis of each component of the PI variabilities showed a remarkable difference in that the PI-LF component, which is widely accepted as an index of sympathetic modulation. SHR

showed a significant increase (2-fold, $p < 0.01$) in PI-LF when compared with the Wistar group ($39 \pm 9 \text{ ms}^2$), suggesting a high sympathetic activity in the hypertensive group. The treatment of SHR with kefir for 60 days caused a significant attenuation of the PI-LF component (~ 1.4 -fold, $p < 0.05$; **Figure 6**, left bar graph). However, when comparison was made using the normalized values of PI-LF, no significant differences were observed among the three groups of animals, suggesting that this result is consistent with there being no difference between SHR and WKY in sympathetic control of the heart. The comparison of values of

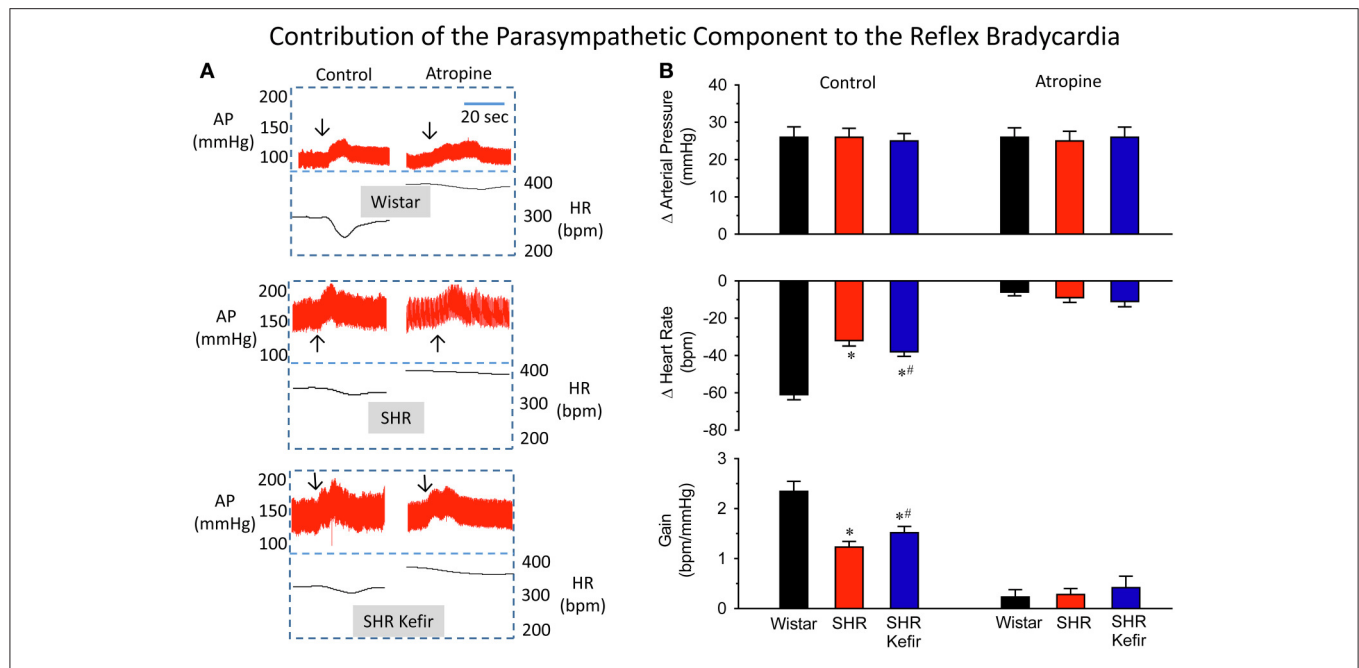


FIGURE 4 | Effects of chronic kefir administration on the reflex bradycardia in SHR compared with non-treated SHR and normotensive Wistar rats. In the three groups of conscious animals, similar phenylephrine-induced increases (~ 25 mmHg) in arterial blood pressure (AP) were used (A): representative recordings of AP and the calculated heart rate (HR) before and after the blockade of the muscarinic receptors with methylatropine. (B): bar graphs showing means values $\pm$ SEM ($n = 10$ to 12 per group) of changes in AP, HR and baroreflex gain. Arrows indicate the moment that the vasoconstrictor was injected. * $p < 0.05$ vs. Wistar group; # $p < 0.05$ vs. non-treated SHR.

PI-HF, which is widely associated with vagal modulation, did not show significant differences comparing the raw data (Figure 6, right bar graph).

The spectral analysis of the BP variability showed a significantly higher variance in the non-treated SHR (73 ± 9 mmHg², $p < 0.05$) when compared with Wistar rats (22 ± 3 mmHg²) and it was reduced, but not normalized, in the SHR-kefir group (65 ± 8 mmHg²). The BP-LF value, which is linked to vasosympathetic tone, was greater in the non-treated SHR group (13 ± 2 mmHg², $p < 0.05$) when compared with the normotensive Wistar rats (3.7 ± 0.4 mmHg²; Figure 6, right bar graph), providing an evidence of a relationship between the high BP, high vascular sympathetic activity and power spectra BP-LF in the SHR. Kefir treatment of SHR for 60 days significantly reduced that value to 8 ± 2 mmHg² (Figure 6, right bar graph).

The analysis of the spontaneous baroreflex sensitivity through the LF α -index in the conditions of a coherence higher than 0.5 and a negative phase, showed that the non-treated SHR exhibited significantly lower sensitivity values than the Wistar group (1.36 ± 0.09 vs. 1.75 ± 0.11 ms/mmHg, $p < 0.05$). Kefir treatment of SHR for 60 days resulted in a tendency (1.48 ± 0.09 ms/mmHg, $p > 0.05$) to attenuation of that dysfunction (Figure 6).

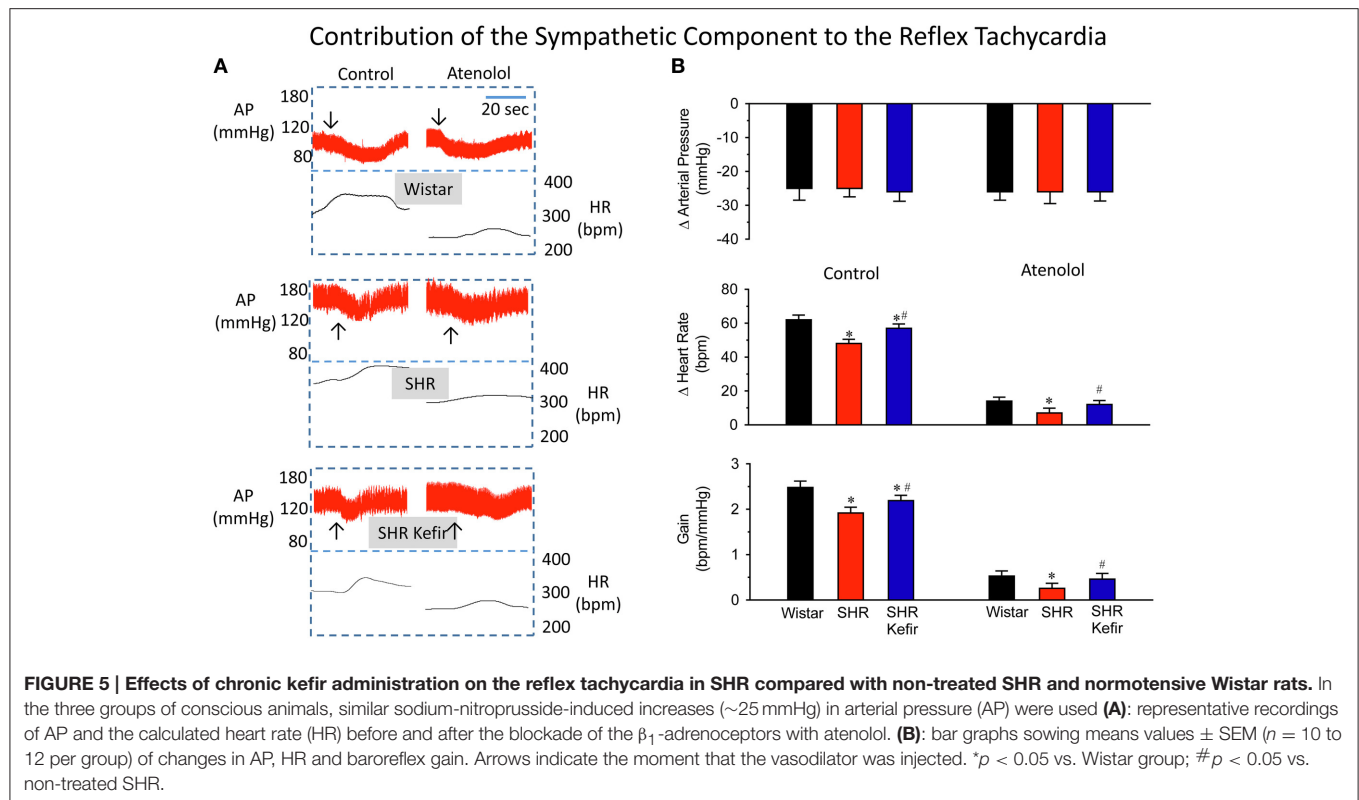
DISCUSSION

The present study investigated the effects of multi-strain kefir on cardiovascular autonomic control and baroreflex sensitivity

in SHR rats, since most of the available studies have focused on isolated bacteria providing limited information on the functional role of the widely consumed beverage obtained by fermentation of milk with kefir grains.

As previously demonstrated by us through microbiological analysis and scanning electron microscopy, the Brazilian kefir grains used in the present study are a complex and a sharing symbiotic mixture of beneficial bacteria and yeasts, including the *Lactobacillus kefirifaciens*, *Lactobacillus kefir*, and *Candida kefir* (Friques et al., 2015). It has been demonstrated that the chronic consumption of kefir has protective effect against the development of high BP, endothelial dysfunction and endothelial surface damage in the SHR model of essential hypertension (Friques et al., 2015).

Despite a large body of evidence supporting the anti-hypertensive effects of kefir, it should be taken into account that these effects may vary depending on the bacterial strain (Million et al., 2012). Most studies have been conducted using different isolated bacterial strains. For instance, it has been demonstrated that the antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in SHR could be through a decrease in pro-oxidative status (Gómez-Guzmán et al., 2015). One of the pro-oxidative contributors could be the activation of the renin-angiotensin system, but in the present study, we did not evaluate the effects of kefir on the angiotensin II in the SHR model. However, the widely consumed kefir beverage presents different microorganisms genera and, in this regard, the probiotic treatment protocol applied in the present work are more like the way humans use kefir.



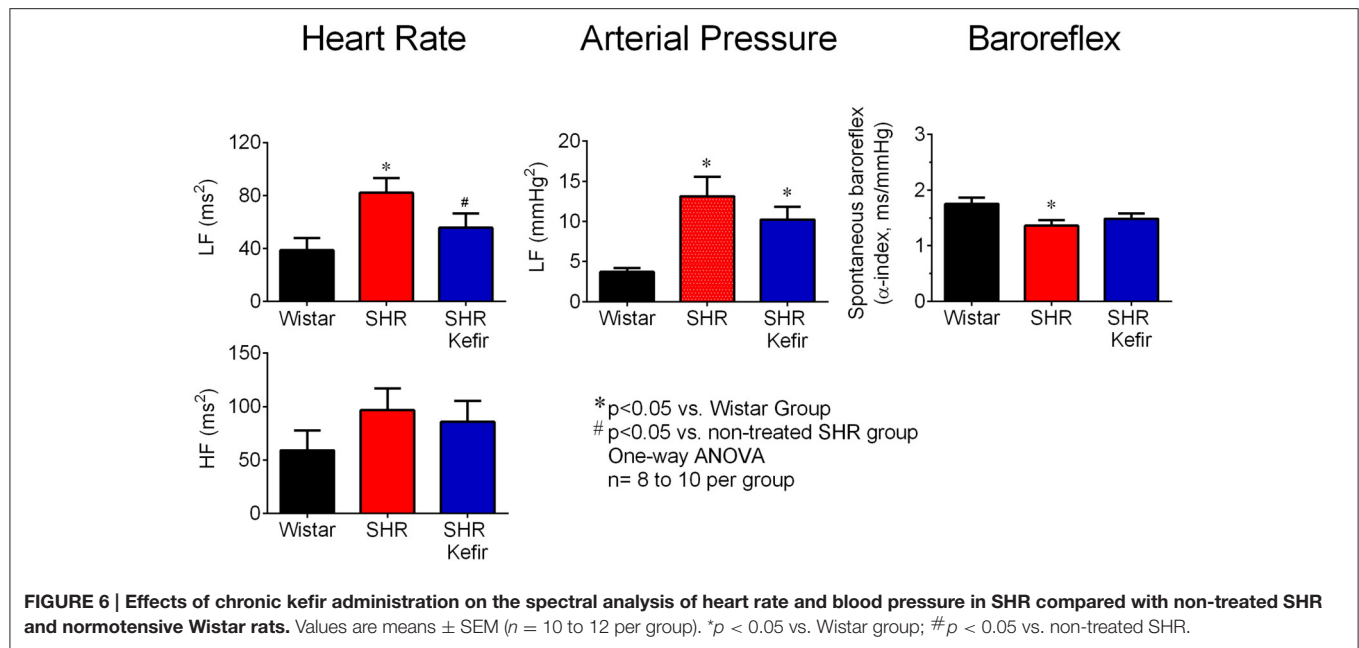
There is emerging evidence of beneficial effects of probiotics in cardiovascular system. However, it is unclear if the promising positive effects evidenced could be due the regulation of cardiovascular autonomic control. We hypothesized that chronic kefir consumption for 60 days may be beneficial in management of autonomic control, based on our previous study showing that administration for shorter periods did not have significant effects on HR, BP and endothelial function (Frigues et al., 2015). Similarly, the present study showed that the chronic administration of kefir for 60 days attenuated high BP and consequently the cardiac hypertrophy. Although the reduction in cardiac hypertrophy could be due to a reduction in afterload and/or in cardiac sympathetic tone, additional studies are necessary to elucidate the mechanism by which kefir administration attenuates the cardiac hypertrophy in this model of hypertension.

Considering that, the imbalance of autonomic nervous system markedly influences the HR and BP and that it has been associated with targeted-organ damage and increased risk of morbi-mortality (Abboud, 2010; Abboud et al., 2012), we assessed the effects of kefir on the cardiac parasympathetic (vagal) tone and cardiac and vascular sympathetic tones in SHR by using two different experimental approaches. First, the parasympathetic cardiovagal and the cardio-vaso-sympathetic tones were evaluated through the classic invasive method illustrated in Figure 3. The increase in HR after administering methylatropine, a muscarinic cholinergic receptor blocker, reflects the cardiovagal tone present under baseline resting conditions, and the decrease in HR after atenolol administration,

a cardiac β_1 -blocker, reflects cardiac sympathetic tone; a double blockade enables the determination of the intrinsic HR. The imbalance between the cardiac vagal activity (decreased) and sympathetic activity (augmented) in SHR is in agreement with other studies (Barbosa Neto et al., 2013). The novelty of the present study is the finding that chronic administration of kefir caused a significant attenuation of the cardiac autonomic imbalance of a similar magnitude to that obtained by physical exercise (Barbosa Neto et al., 2013), phototherapy (Monteiro et al., 2012), and pharmacological medication (Dias da Silva et al., 2002).

It has been shown that a disruption in the balance between vagal and sympathetic tones can lead to an impairment in baroreflex sensitivity, as has been demonstrated in different models of arterial hypertension (Moyses et al., 1994; Campagnaro et al., 2012), including the SHR (Dias da Silva et al., 2002; Monteiro et al., 2012). Therefore, the effect of kefir on the impaired baroreflex that characterizes SHR was tested in a separated set of experiments using the classical invasive pharmacological maneuvers by which reflex bradycardia during phenylephrine-induced increases in BP and reflex tachycardia during sodium nitroprusside-induced decreases in BP are analyzed (Moyses et al., 1994; Campagnaro et al., 2012).

The present study is the first to demonstrate that Kefir treatment for 60 days ameliorated the impaired baroreflex sensitivity observed in SHR. When the procedure was repeated under the blockade action of methylatropine the reflex bradycardia and baroreflex gain was abolished in the three groups of animals, indicating that the impaired baroreflex during



increases in BP was solely due to the vagal component. On the other hand, when the BP was lowered under the action of the blocker atenolol, the reflex tachycardia was markedly reduced, but this reduction was to a much lesser extent in the Wistar group. Therefore, our data demonstrate that reflex tachycardia is a consequence of both the activation of the cardiac sympathetic component and the simultaneous withdrawn of the parasympathetic activity, which is in agreement with others (Moyses et al., 1994; Campagnaro et al., 2012), and favors the notion that physiological interventions always elicits reciprocal changes in sympathetic and parasympathetic nerve activities. Thus, the tachycardia in response to falls in BP observed could, at least in part, be due to a concurrent vagal activity withdrawal in the Wistar group and possibly in the SHR because the vagal tone was impaired and consequently less effective. In agreement with the review of Head (1994), we observed that the diminished sensitivity of the baroreflex in SHR (characterized by hypertension and cardiac hypertrophy) is mainly due to reduced capacity of the cardiac vagal component rather than a change of the sympathetic (our data: -35 and -23%, respectively). Our data show that kefir treatment of SHR was able to attenuate the impaired baroreflex sensitivity by restoring part of the cardiac autonomic activity. A possible mechanism for the beneficial effect of kefir on the vagal-mediated baroreflex sensitivity in this model of hypertension could be through the reduction of the cardiac hypertrophy as observed by using different probiotics (Lin et al., 2012; Gan et al., 2014; Gómez-Guzmán et al., 2015). Therefore, in addition to other non-pharmacological therapies, such as physical exercise (Ceroni et al., 2009), the chronic administration of the nutritional probiotic kefir appears to have beneficial actions targeting the restoration of the balance between the vagal and sympathetic activities and improving the baroreflex function in hypertensive subjects.

The influence of the autonomic nervous system on the BP and PI is frequency-dependent and the power spectral analysis

of beat-to-beat BP recordings has been increasingly used as a valuable non-invasive tool to evaluate the autonomic nervous system modulation on HR and BP in both experimental animals (Murphy et al., 1991; Ceroni et al., 2009; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2013) and humans (Silva et al., 2009). We used, in a separated set of experiments, spectral analysis to additionally assess the relative contribution of the sympathetic and vagal tones and their contribution in the reflex activities on conscious SHR chronically treated with kefir when compared with non-treated SHR and normotensive Wistar rats.

In the present study, we observed that kefir significantly reduced the increased cardiac sympathetic tone, which was evaluated through pharmacological blockade and that it reduced the HR variability (or the LF spectra power of PI) in the SHR. It has been demonstrated that LF spectral power of HR is modulated by the autonomic nervous system (Parati et al., 1995; Stauss, 2007; Silva et al., 2009; Chappleau and Sabharwal, 2011). Therefore, a plausible mechanism by which this probiotic partly restores the normal cardiac sympathetic tone and the PI variability may include a direct or indirect inhibition of the sympathetic nerve transmission at its origin in the central nervous system or at the innervation site in the heart. This speculation is corroborated by the finding that the ganglionic blockade (Diedrich et al., 2002) and cardiac muscarinic blockade reduce HR variability (Médigue et al., 2001). Specifically, an important mechanism of action of kefir at the autonomic nervous system could include a decrease in the production of reactive oxygen species and increase of nitric oxide availability, linking the present results to the hypotensive effects of kefir in this genetic model of hypertension, recently reported by Friques et al. (2015).

The PI-LF and BP-LF components, which have been considered markers of cardiac and vascular sympathetic neural activity (Parati et al., 1995; Task Force, 1996), were significantly augmented in SHR when compared with Wistar rats. This

finding is consistent with other results (Ceroni et al., 2009; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2013). However, the use of LF as an estimative of pure sympathetic activity to the heart has been challenged (Reyes del Paso et al., 2013) and considered a reflection of sympathetic and parasympathetic nerve activities. Increased BP variability is closely correlated to end-organ damage in normotensive and hypertensive animals, and the pharmacologic reduction of BP variability attenuates hypertension outcomes to target-organs (Su and Miao, 2001, 2005). Additionally, our data showed that kefir administered for 60 days to SHR partially corrected the abnormal LF component, suggesting that it could become a non-pharmacological alternative for prevention/treatment of organ-damages associated with increased BP and PI variabilities.

The PI-HF component, which has often been considered a marker of cardiac vagal activity (Dantas et al., 2010), was similar in the Wistar and SHR, consistent with other findings (Ceroni et al., 2009; Barbosa Neto et al., 2013). However, this component does not seem to be solely attributed to cardiac vagal activity, it is also influenced by respiration (Chapleau and Sabharwal, 2011; Reyes del Paso et al., 2013). Additionally, no significant differences were observed among the three groups when we used the LF-to-HF ratio to estimate the sympathovagal balance (Kuwahara et al., 1994; Parati et al., 1995; Task Force, 1996). Kefir treatment did not alter the above parameters. However, the use of the LF/HF ratio as a measure of sympathovagal balance can be misleading (Chapleau and Sabharwal, 2011). The very low frequency (VLF) component was not analyzed in the present study because its physiological correlates are still not clear.

The ratio between the absolute powers of PI-LF and BP-LF, the LF α -index, which has shown to express the spontaneous baroreflex sensitivity (Silva et al., 2009; Dantas et al., 2010, 2012), was diminished in the SHR, which was consistent with other studies (Silva et al., 2009) and the treatment with kefir restored the normal values. As described by Fazan et al. (2005), baroreflex modulation of HR contributes to LF, but not HF variability and is mediated by both sympathetic and parasympathetic drives. Therefore, increased BP variability, which is closely correlated with end-organ damage in hypertensive conditions (Su and Miao, 2001, 2005), can be ameliorated with pharmacological treatment (Su and Miao, 2001; Dias da Silva et al., 2002) and with non-pharmacological interventions, such as with physical exercise (Ceroni et al., 2009) and treatment with flavonoids (Monteiro et al., 2012). Additionally, we demonstrated for the first time that increased BP variability could also account (alternatively or additionally) for beneficial effects of the probiotic kefir, reducing BP variability attenuates end-organ damage. However, we may take into account that, different from the classical pharmacologic approach, the use of variabilities give us only an indirect estimation of the cardiac sympathetic and vagal tone.

The effects of hypertension in target organs could be associated with impaired autonomic function due to increased cerebrovascular oxidative stress and inflammation (Toth et al., 2013). Although our data do not allow us to state precise mechanisms, we speculate that the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines and between pro- and anti-oxidant

molecules could also occur in central areas of neural control of the cardiovascular system, as based on an extrapolation of data from others showing that the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) contributes to sympathoexcitation, hypertension and cardiac hypertrophy in the SHR (Jia et al., 2014). Because kefir is a probiotic beverage with anti-inflammatory (Carasi et al., 2015) and anti-oxidant (Friques et al., 2015) properties, we suggest that the findings of the present study may possible be due to a decreased production of cytokines and reactive oxygen species in the hypothalamic PVN which attenuates hypertension and end-organ damage by up-regulating anti-inflammatory and anti-oxidant molecules, restoring the normal balance (Tan et al., 2015).

In conclusion, the contribution of the cardiac sympathetic and parasympathetic tones and their relative contribution to the baroreflex activities were assessed through classical pharmacologic approaches and spectral analysis. The novelty of this study is that daily administration of kefir for 60 days partly corrects the alterations in cardiac function (including autonomic tone, baroreflex sensitivity) and PI and BP variability in SHR. Therefore, increased BP variability, which is closely correlated with end-organ damage in hypertensive conditions, now could be ameliorate with the beneficial effects of the probiotic kefir, in addition to pharmacological and non-pharmacological therapies.

LIMITATIONS AND FUTURE DIRECTIONS

A limitation of the present study is that measurement of changes in HR and BP in the protocols we have designed are not sufficient to identify the mechanism of action by which kefir attenuates the abnormalities in the autonomic control of the heart and vessels. Therefore, the present data provide new insights in the prevention/treatment of abnormal vagal and sympathetic control of heart and vessels and opens new avenues for searching the mechanisms involved in the beneficial effects of kefir of the heart and vessels.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Preparation and administration of kefir: LD and AF; Microbiological analysis of kefir: TA; Hemodynamic measurements: BK and ML; Acquisition and analysis of data from cardiac tones and baroreceptor reflex sensitivity: LD, BK, and AG; Spectral analysis: ED and RD; Critical revision of the manuscript: SM and TP; Conception, study's design, supervision and co-supervision of the study: EV and BC. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

EV is supported by CNPq (Ref. 476525/2012-8 and 303001/2015-1) and Fapes (Grant Universal 2014 Proc 67597482). SM is supported by CNPq (307584/2015-1). BC is supported by CNPq (445736/2014-3). TP is supported by CNPq (445080/2014-0). TA is supported by FAPES/CNPq/MS-Decit/SESA (10-2013-PPSUS-Ref 65835131).

REFERENCES

- Abboud, F. M. (2010). The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: the wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1449–R1467. doi: 10.1152/ajpregu.00130.2010
- Abboud, F. M., Harwani, S. C., and Chappleau, M. W. (2012). Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension* 59, 755–762. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186833
- Abreu, G. R., Futuro Neto, H. A., Cabral, A. M., and Vasquez, E. C. (1998). Ouabain produces diverse excitatory effects on afferent baroreceptor nerve activity in SHR and WKY animals. *Clin. Exp. Hypertens.* 20, 85–94. doi: 10.3109/10641969809053208
- Astrup, A. (2014). Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1235S–1242S. doi: 10.3945/ajcn.113.073015
- Barbosa Neto, O., Abate, D. T., Marocolo Júnior, M., Mota, G. R., Orsatti, F. L., Rossi e Silva, R. C., et al. (2013). Exercise training improves cardiovascular autonomic activity and attenuates renal damage in spontaneously hypertensive rats. *J. Sports Sci. Med.* 12, 52–59.
- Blanco, J. H., Gastaldi, A. C., Gardim, C. B., Araujo, J. E., Simões, M. V., Oliveira, L. F., et al. (2015). Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. *Auton. Neurosci.* 193, 97–103. doi: 10.1016/j.autneu.2015.09.002
- Campagnaro, B. P., Gava, A. L., Meyrelles, S. S., and Vasquez, E. C. (2012). Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular Angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Int. J. Hypertens.* 2012:968123. doi: 10.1155/2012/968123
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., and Urdaci, M. C. (2015). Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. *J. Immunol. Res.* 2015:361604. doi: 10.1155/2015/361604
- Ceroni, A., Chaar, L. J., Bombein, R. L., and Michelini, L. C. (2009). Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp. Physiol.* 94, 630–640. doi: 10.1113/expphysiol.2008.046128
- Chappleau, M. W., and Sabharwal, R. (2011). Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail. Rev.* 16, 109–127. doi: 10.1007/s10741-010-9174-6
- Dantas, E. M., Gonçalves, C. P., Silva, A. B., Rodrigues, S. L., Ramos, M. S., Andreão, R. V., et al. (2010). Reproducibility of heart rate variability parameters measured in healthy subjects at rest and after a postural change maneuver. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 982–988. doi: 10.1590/S0100-879X2010007500101
- Dantas, E. M., Pimentel, E. B., Andreão, R. V., Cichoni, B. S., Gonçalves, C. P., Zaniqueli D dos, A., et al. (2013). Carvedilol recovers normal blood pressures variability in rats with myocardial infarction. *Auton. Neurosci.* 177, 231–236. doi: 10.1016/j.autneu.2013.05.007
- Dantas, E. M., Sant'Anna, M. L., Andreão, R. V., Gonçalves, C. P., Morra, E. A., Baldo, M. P., et al. (2012). Spectral analysis of heart rate variability with the autoregressive method: what model order to choose? *Comput. Biol. Med.* 42, 164–170. doi: 10.1016/j.combiomed.2011.11.004
- Dias da Silva, V. J., Viana Público, C. C., de Melo Alves, R., Fazan, R. Jr., Ruscone, T. G., Porta, A., et al. (2002). Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Auton. Neurosci.* 95, 88–96. doi: 10.1016/S1566-0702(01)00365-4
- Diedrich, A., Jordan, J., Shannon, J. R., Robertson, D., and Biaggioni, I. (2002). Modulation of QT interval during autonomic nervous system blockade in humans. *Circulation* 106, 2238–2243. doi: 10.1161/01.CIR.0000035241.76918.6C
- Fazan, R. Jr., de Oliveira, M., da Silva, V. J., Joaquim, L. F., Montano, N., Porta, A., et al. (2005). Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1968–H1975. doi: 10.1152/ajpheart.01224.2004
- Frigues, A. G., Arpini, C. M., Kalil, I. C., Gava, A. L., Leal, M. A., Porto, M. L., et al. (2015). Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Transl. Med.* 13, 390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7
- Gan, X. T., Ettinger, G., Huang, C. X., Burton, J. P., Haist, J. V., Rajapurohitam, V., et al. (2014). Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ. Heart Fail.* 7, 491–499. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000978
- Gava, A. L., Peotta, V. A., Cabral, A. M., Meyrelles, S. S., and Vasquez, E. C. (2004). Decreased baroreflex sensitivity in isoproterenol-treated mice with cardiac hypertrophy. *Auton. Neurosci.* 114, 47–54. doi: 10.1016/j.autneu.2004.07.003
- Gómez-Guzmán, M., Toral, M., Romero, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., et al. (2015). Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 2326–2336. doi: 10.1002/mnfr.201500290
- Hayward, L. F., Castellanos, M., and Noah, C. (2012). Cardiorespiratory variability following repeat acute hypoxia in the conscious SHR versus two normotensive rat strains. *Auton. Neurosci.* 171, 58–65. doi: 10.1016/j.autneu.2012.10.008
- Head, G. A. (1994). Cardiac baroreflexes and hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21, 791–802. doi: 10.1111/j.1440-1681.1994.tb02448.x
- Jakala, P., Pere, E., Lehtinen, R., Turpeinen, A., Korpela, R., and Vapaatalo, H. (2009). Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 11–20.
- Jia, L. L., Kang, Y. M., Wang, F. X., Li, H. B., Zhang, Y., Yu, X. J., et al. (2014). Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS ONE* 9:e85481. doi: 10.1371/journal.pone.0085481
- Kuwahara, M., Yayou, K., Ishii, K., Hashimoto, S., Tsubone, H., and Sugano, S. (1994). Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *J. Electrocardiol.* 27, 333–337. doi: 10.1016/S0022-0736(05)80272-9
- Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Kuo, W. W., Lin, C. C., Tsai, F. J., Tsai, C. H., et al. (2012). Inhibition of cardiac hypertrophy by probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in spontaneously hypertensive rat hearts. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1365–1375. doi: 10.3892/ijmm.2012.1154
- Médigue, C., Girard, A., Laude, D., Monti, A., Wargon, M., and Elghozi, J. L. (2001). Relationship between pulse interval and respiratory sinus arrhythmia: a time- and frequency-domain analysis of the effects of atropine. *Pflugers Arch.* 441, 650–655. doi: 10.1007/s004240000486
- Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougou, F., Leibovici, L., and Raoult, D. (2012). Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb. Pathog.* 53, 100–108. doi: 10.1016/j.micpath.2012.05.007
- Monteiro, M. M., França-Silva, M. S., Alves, N. F., Porpino, S. K., and Braga, V. A. (2012). Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules* 17, 12997–13008. doi: 10.3390/molecules17112997
- Moyses, M. R., Cabral, A. M., Bissoli, N., and Vasquez, E. C. (1994). Time course of changes in sigmoidal-fitting baroreceptor curves in one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 23(Suppl.1), I87–I92.
- Murphy, C. A., Sloan, R. P., and Myers, M. M. (1991). Pharmacologic responses and spectral analyses of spontaneous fluctuations in heart rate and blood pressure in SHR rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 36, 237–250. doi: 10.1016/0165-1838(91)90047-7
- Parati, G., Saul, J. P., Di Rienzo, M., and Mancia, G. (1995). Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 25, 1276–1286.
- Quagliotto, E., Casali, K. R., Dal Lago, P., and Rasia-Filho, A. A. (2015). Neuropeptides in the posterodorsal medial amygdala modulate central cardiovascular reflex responses in awake male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48, 128–139. doi: 10.1590/1414-431X20144095
- Reyes del Paso, G. A., Langewitz, W., Mulder, L. J., van Roon, A., and Duschek, S. (2013). The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: a review with emphasis on a reanalysis of previous studies. *Psychophysiology* 50, 477–487. doi: 10.1111/psyp.12027
- Schenberg, L. C., Brandão, C. A., and Vasquez, E. C. (1995). Role of periaqueductal gray matter in hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 26, 1125.
- Silva, G. J., Ushizima, M. R., Lessa, P. S., Cardoso, L., Drager, L. F., Atala, M. M., et al. (2009). Critical analysis of autoregressive and fast Fourier transform markers of cardiovascular variability in rats and humans. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 386–396. doi: 10.1590/S0100-879X2009000400012

- Stauss, H. M. (2007). Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 362–368. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04588.x
- Su, D. F., and Miao, C. Y. (2001). Blood pressure variability and organ damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 709–715. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03508.x
- Su, D. F., and Miao, C. Y. (2005). Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 388–390. doi: 10.1016/j.tips.2005.06.003
- Tan, H., Cui, W., Chen, W., Zhu, G. Q., Qin, D. N., and Kang, Y. M. (2015). Inhibition of NF- κ B activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 315–322. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.023
- Task Force (1996). Task Force of the european society of cardiology and the north american society of pacing and electrophysiology heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.* 17, 354–381.
- Toth, P., Csiszar, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Cseplo, P., Springo, Z., et al. (2013). Treatment with the cytochrome P450 ω -hydroxylase inhibitor HET0016 attenuates cerebrovascular inflammation, oxidative stress and improves vasomotor function in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1878–1888. doi: 10.1111/bph.12079
- Turpeinen, A. M., Ehlers, P. I., Kivimäki, A. S., Järvenpää, S., Filler, I., Wiegert, E., et al. (2011). Ile-Pro-Pro and ValPro-Pro tripeptide-containing milk product has acute blood pressure lowering effects in mildly hypertensive subjects. *Clin. Exp. Hypertens.* 33, 388–396. doi: 10.3109/10641963.2010.549267
- Vasquez, E. C., Meyrelles, S. S., Mauad, H., and Cabral, A. M. (1997). Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 521–532. doi: 10.1590/S0100-879X1997000400014
- Vasquez, E. C., Peotta, V. A., and Meyrelles, S. S. (2012). Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Cell Physiol. Biochem.* 29, 635–646. doi: 10.1159/000277623

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Klippel, Duemke, Leal, Friques, Dantas, Dalvi, Gava, Pereira, Andrade, Meyrelles, Campagnaro and Vasquez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.