



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro de Educação e Humanidades**

**Instituto de Educação Física e Desportos**

**André Luiz da Silva Teixeira**

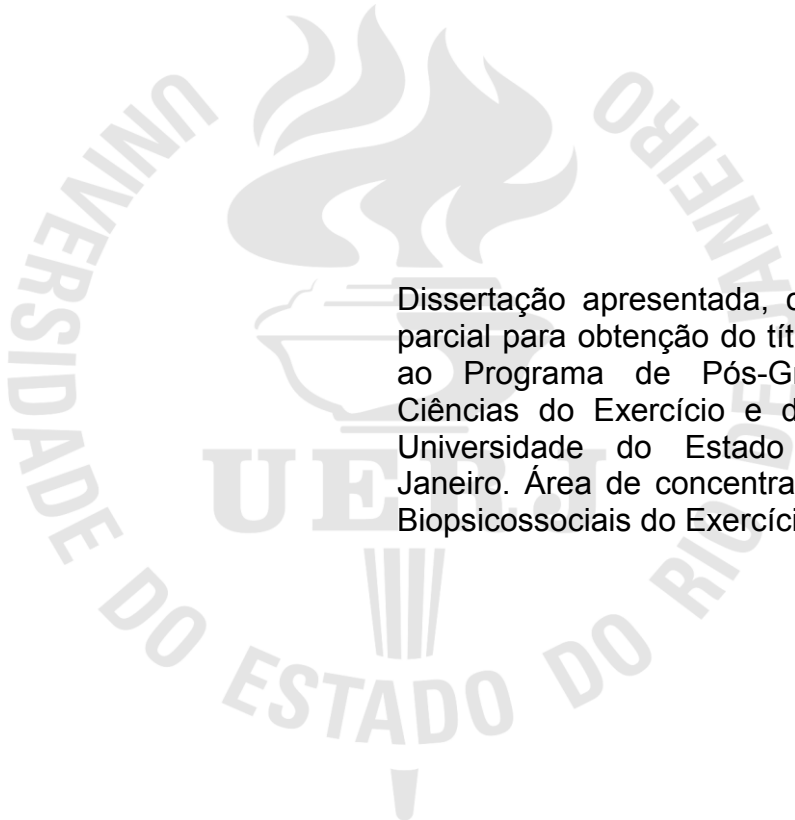
**Influência do ciclo menstrual e o uso de contraceptivos no controle  
autônomo cardíaco durante o repouso e na transição repouso-  
exercício**

**Rio de Janeiro**

**2015**

André Luiz da Silva Teixeira

**Influência do ciclo menstrual e o uso de contraceptivos no controle  
autônomo cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Exercício e do Esporte da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Aspectos Biopsicossociais do Exercício Físico.

Orientador: Prof. Dr. Djalma Rabelo Ricardo

Coorientador: Prof. Dr. Plinio dos Santos Ramos

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/B

T266 Teixeira, André Luiz da Silva.

Influência do ciclo menstrual e o uso de contraceptivos no controle autonômico cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício / André Luiz da Silva Teixeira. – 2015.  
96 f. : il.

Orientador: Djalma Rabelo Ricardo

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Educação Física e Desportos.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos – Teses. 2. Ciclo menstrual – Teses. 3. Sistema nervoso autônomo – Teses. 4. Variabilidade do batimento cardíaco – Teses. 5. Anticoncepcionais orais - Teses. I. Ricardo, Djalma Rabelo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Educação Física e Desportos. III. Título.

CDU 796:616.12-008

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

André Luiz da Silva Teixeira

**Influência do ciclo menstrual e o uso de contraceptivos no controle  
autônomo cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Exercício e do Esporte da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Aspectos Biopsicossociais do Exercício Físico.

Aprovada em 10 de agosto de 2015.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Djalma Rabelo Ricardo (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde - FCMS/JF

---

Prof. Dr. Lauro Casqueiro Vianna  
Universidade de Brasília - UnB

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Nádia Souza Lima da Silva  
Instituto de Educação Física e Desportos - UERJ

Rio de Janeiro  
2015

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditaram e caminharam junto comigo nesse projeto. Em especial aos meus pais Flávio e Tila, aos meus irmãos Isabela e Leonardo e aos meus professores e orientadores Djalma, Plínio e Lauro.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família pelo apoio incansável. Em especial aos meus pais Flávio e Tila que sempre abdicaram dos seus próprios sonhos para tornarem os nossos possíveis. Não posso descrever em poucas linhas meu eterno amor e gratidão. Aos meus irmãos Isabela e Leonardo pelo amor e carinho de sempre. Eu amo vocês!

Agradeço ao meu orientador Prof. Djalma Rabelo Ricardo que, mesmo sem me conhecer, abriu todas as portas e tornou esse trabalho possível. Muito obrigado por ter acreditado em mim e nesse projeto. Você é, realmente, um exemplo de professor e orientador que eu gostaria de me tornar um dia.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador Prof. Plinio dos Santos Ramos e aos amigos do grupo de pesquisa da SUPREMA, em especial ao Tiago Casali e a Ana Paula Ferreira. Vocês foram fundamentais para minha formação. Muito obrigado por todos os ensinamentos. Agradeço também ao Prof. Lauro Vianna, meu atual orientador. Suas contribuições foram fundamentais para conseguirmos publicar nossos artigos. Muito obrigado por tudo, em especial pela confiança nessa nova jornada.

Por último, não poderia deixar de agradecer aos meus amigos e à todas as voluntárias que fizeram parte desse estudo. Foram muitos dias de testes, coletas de sangue no hospital e depois avaliação na SUPREMA, muitas vezes aos sábados e domingos, mas vocês foram incansáveis. Muito obrigado por confiarem em nosso trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

*Cora Coralina*

## RESUMO

TEIXEIRA, André Luiz da Silva. *Influência do ciclo menstrual e o uso de contraceptivos no controle autonômico cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício*. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Exercício e do Esporte) – Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O ciclo menstrual (CM) possui uma natureza cíclica que dura em média 28 dias onde as variações nas concentrações dos hormônios gonadais femininos, principalmente de estrogênio e progesterona, determinam suas três fases: folicular, ovulatória e lútea. O uso de contraceptivos orais (CO) é uma estratégia muito utilizada pelas mulheres para evitar a gravidez em que as pílulas promovem uma dosagem hormonal constante o que evita essa oscilação periódica. Devido a algumas ações cardiovasculares relacionadas aos hormônios sexuais femininos, diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de verificar a influência do CM no controle autonômico cardíaco em repouso. Nesse sentido, a presente pesquisa tem como objetivo verificar a influência do CM e o uso de CO no controle autonômico cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício. Para isso, três estudos específicos foram desenvolvidos (uma revisão sistematizada e dois artigos originais). Os resultados da revisão sistematizada demonstraram que as diferentes fases do CM podem modificar a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em repouso de mulheres que não utilizam CO, sendo que a fase folicular é caracterizada por um aumento da atividade vagal cardíaca e a fase lútea por um aumento da atividade nervosa simpática (Estudo 1). Através dessa revisão, foi observado que a grande maioria dos estudos utilizavam apenas mulheres que não utilizavam CO, sendo que a influência do uso de CO no controle cardiovascular não estava claro. Nesse sentido, nós recrutamos 17 voluntárias entre 19 e 31 anos que utilizavam CO por um período mínimo de seis meses e analisamos VFC durante duas fases: a fase ativa do uso de CO e a fase sem a utilização de CO (Estudo 2). Os resultados demonstraram que a VFC não é modificada pelo CM em mulheres que utilizam CO. Além disso, buscamos verificar a influência do CM e o uso de CO no controle autonômico cardíaco no início do exercício dinâmico (Estudo 3). Para isso, 13 mulheres que não utilizavam CO e 17 usuárias de CO foram avaliadas através do teste de exercício de quatro segundos nas três diferentes fases do CM (folicular, ovulatória e lútea). Os resultados demonstraram que as diferentes fases do CM ou a utilização de CO não modificam a retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício. Esses resultados nos permitem concluir que o CM pode modificar a VFC em repouso de mulheres que não utilizam CO, sendo que essa variação não ocorre em usuárias de CO. Além disso, a retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício não é influenciada pelas diferentes fases do CM independente do uso de CO.

Palavras-chave: Sistema nervoso autônomo. Variabilidade da frequência cardíaca.

Agentes contraceptivos. Estrogênio. Progesterona.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, André Luiz da Silva. *Influence of menstrual cycle and oral contraceptive pills on cardiac autonomic control at rest and rest to exercise transition*. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Exercício e do Esporte) – Instituto de Educação Física e Desportos, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The menstrual cycle (MC) has a cyclical nature that lasts approximately 28 days in which variations of female sex hormones, particularly estrogen and progesterone, determine its three phases: follicular, ovulatory and luteal. The use of oral contraceptive pills (OCP) is a strategy often used by women to prevent pregnancy, in which a constant dosage of female hormones attenuates these cyclical variations. Due to the cardiovascular effects related to female hormones, several studies were performed in order to assess the influence of MC on cardiac autonomic control at rest. In this sense, the present study aims to determine the influence of MC and the use of OCP on cardiac autonomic control at rest and rest to exercise transition. For this, three specific studies have been developed (one systematic review and two original papers). The results of systematic review showed that the different phases of MC may modify the heart rate variability (HRV) in non-users of OCP, wherein the follicular phase is characterized by an increase in cardiac vagal activity and the luteal phase by an increase in sympathetic activity (Study 1). Through this review research, we observed that most studies used only women who did not use OCP, and the influence of OCP use in cardiovascular control needs to be further explored. Accordingly, we recruited 17 volunteers aged 19-31 years who were OCP users for at least six consecutive months, and analyzed the HRV during two phases: active phase of OCP use and placebo phase without the use of OCP. The results demonstrate that the HRV is not modified by the administration of OCP. We also seek to verify the influence of MC and the use of OCP on cardiac autonomic control at the onset of dynamic exercise (Study 3). For this, 13 non-OCP users and 17 OCP users were evaluated by the 4-second exercise test during three different phases of the MC (follicular, ovulatory and luteal). The results showed that the MC or OCP use does not modify the cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise. These results allow us to conclude that the MC may modify the resting HRV in women not using OCP, and this change does not occur in OCP users. In addition, the cardiac vagal withdrawal at rest to exercise transition is not influenced by the different phases of the MC regardless of the use of OCP.

Keywords: Autonomic nervous system. Heart rate variability. Contraceptive agents. Estrogen. Progesterone

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                          |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – | Fluxograma dos artigos selecionados.....                                                                 | 18 |
| Figura 2 – | Índices da VFC no domínio da frequência.....                                                             | 26 |
| Figura 3 – | Razão entre os componentes de baixa e alta frequência<br>(LF/HF).....                                    | 27 |
| Figura 4 – | Cálculo do índice vagal cardíaco (IVC) durante o T4s em uma<br>das participantes.....                    | 31 |
| Figura 5 – | Níveis de estradiol e progesterona entre os grupos de<br>usuárias e não usuárias de CO durante o CM..... | 34 |
| Figura 6 – | Retirada vagal cardíaca representada pelo IVC nas diferentes<br>fases do CM.....                         | 35 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                |    |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – | Critérios de inclusão e exclusão aplicados e resultados analisados .....                       | 17 |
| Tabela 1 – | Sumário dos estudos e seus principais resultados .....                                         | 20 |
| Tabela 2 – | Valores hormonais e hemodinâmicos .....                                                        | 25 |
| Tabela 3 – | VFC no domínio do tempo .....                                                                  | 25 |
| Tabela 4 – | Dados descritivos da amostra .....                                                             | 33 |
| Tabela 5 – | Valores hemodinâmicos durante o CM no grupo de usuárias e não usuárias de contraceptivos ..... | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |                                                                                     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| C       | Celsius                                                                             |
| cm      | Centímetros                                                                         |
| CM      | Ciclo menstrual                                                                     |
| CO      | Contraceptivos orais                                                                |
| DP      | Desvio padrão                                                                       |
| SDNN    | Desvio padrão de todos os intervalos RR                                             |
| ECG     | Eletrocardiograma                                                                   |
| FC      | Frequência cardíaca                                                                 |
| Hz      | Hertz                                                                               |
| HF      | High frequency (alta frequência)                                                    |
| HH      | High hormone phase (fase hormonal alta)                                             |
| IMC     | Índice de massa corporal                                                            |
| IVC     | Índice vagal cardíaco                                                               |
| kg      | Kilograma                                                                           |
| LF      | Low frequency (baixa frequência)                                                    |
| LH      | Low hormone phase (fase hormonal baixa)                                             |
| RRB     | Maior intervalo RR pré-exercício                                                    |
| RRC     | Menor intervalo RR durante o exercício                                              |
| Hg      | Mercúrio                                                                            |
| m       | Metros                                                                              |
| mg      | Miligramas                                                                          |
| mL      | Mililitros                                                                          |
| ms      | Milissegundos                                                                       |
| ng      | Nanogramas                                                                          |
| MedLine | National Library of Medicine                                                        |
| No OCP  | Non-OCP users (não usuárias de contraceptivos orais)                                |
| nu      | Normality units (unidades normalizadas)                                             |
| OCP     | OCP users (usuárias de contraceptivos orais)                                        |
| pNN50   | Percentual de intervalos RR consecutivos que apresentaram diferença maior que 50 ms |

|       |                                                                                        |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| pg    | Piligramas                                                                             |
| PA    | Pressão arterial                                                                       |
| PAD   | Pressão arterial diastólica                                                            |
| PAM   | Pressão arterial média                                                                 |
| PAS   | Pressão arterial sistólica                                                             |
| rMSSD | Raiz quadrada da média das diferenças ao quadrado dos sucessivos intervalos RR normais |
| rpm   | Rotações por minuto                                                                    |
| SPM   | Síndrome pré-menstrual                                                                 |
| T4s   | Teste de exercício de quatro segundos                                                  |
| TP    | Total power (poder total)                                                              |
| TDPM  | Transtorno disfórico pré-menstrual                                                     |
| VFC   | Variabilidade da frequência cardíaca                                                   |

## SUMÁRIO

|            |                                                                   |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------|-----------|
|            | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                           | <b>13</b> |
| <b>1</b>   | <b>OBJETIVO .....</b>                                             | <b>14</b> |
| <b>1.1</b> | <b>Objetivo geral .....</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>1.2</b> | <b>Objetivos específicos .....</b>                                | <b>14</b> |
| <b>2</b>   | <b>ESTUDO 1 .....</b>                                             | <b>15</b> |
| <b>3</b>   | <b>ESTUDO 2 .....</b>                                             | <b>21</b> |
| <b>4</b>   | <b>ESTUDO 3 .....</b>                                             | <b>28</b> |
|            | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                            | <b>37</b> |
|            | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                           | <b>43</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                          | <b>43</b> |
|            | <b>ANEXO A – Artigo 2 publicado .....</b>                         | <b>51</b> |
|            | <b>ANEXO B – Artigo 3 publicado .....</b>                         | <b>72</b> |
|            | <b>ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b> | <b>95</b> |

## INTRODUÇÃO

O ciclo menstrual (CM) é um fenômeno biológico que dura em média 28 dias em que as variações nas concentrações hormonais, principalmente de estrogênio e progesterona, determinam suas três fases: folicular, ovulatória e lútea (Zuckerman, 1932). Na fase folicular os níveis séricos de estrogênio e progesterona são baixos; durante a fase ovulatória ocorre um pico de estrogênio e os níveis de progesterona permanecem baixos, já na fase lútea ocorre um pico de progesterona acompanhado por um pico menor de estrogênio (Zuckerman, 1932). Nesse sentido, a utilização de contraceptivos orais (CO) é uma estratégia muito utilizada para evitar a gravidez, em que uma dosagem exógena constante dos hormônios sexuais femininos evita essa oscilação periódica (Beller e McCartney, 2013).

Devido à sua complexidade, o CM tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos em fatores como a força muscular (Lua *et al.*, 2015), a flexibilidade (Teixeira *et al.*, 2012a), a composição corporal (Teixeira *et al.*, 2012b), a potência anaeróbia (Tsampoukos *et al.*, 2010), a percepção corporal (Teixeira *et al.*, 2013a), a função cardiovascular (Teixeira *et al.*, 2012c), entre outros. Em uma busca simples com o descritor “*menstrual cycle*” no *PubMed*, mais de 22 mil referências aparecem, no entanto, se essa busca for mais completa, utilizando todos os termos semelhantes (*MeSh*) que envolvem o descritor “*menstrual cycle*”, esse número passa para mais de 329 mil evidências, sendo cerca de 13% apenas nos últimos cinco anos, demonstrando a importância dessa temática para a comunidade científica.

A frequência cardíaca (FC) é modulada pelo sistema nervoso autônomo através dos ramos simpático e parassimpático sobre a auto-ritimicidade do nódulo sinusal (Boyett, 2009). Em repouso, há uma predominância da via parassimpática, fazendo com que a FC se mantenha em valores mais baixos. Na transição repouso-exercício, o aumento rápido da FC é predominantemente mediado por uma retirada vagal (parassimpática) e, com o posterior incremento da intensidade do exercício, a FC aumenta devido a um aumento da atividade nervosa simpática (Frageus e Linnarsson, 1976; White & Raven, 2014). Devido a algumas ações cardiovasculares associadas aos hormônios gonadais femininos, principalmente ao estrogênio (Mendelsohn e Karas, 1999; Xing *et al.*, 2009), diversos estudos foram conduzidos

com o objetivo de verificar a influência das diferentes fases do CM no controle cardiovascular.

O primeiro estudo encontrado no *PubMed* associando o CM com o comportamento cardiovascular foi publicado em 1950 (Sahloff, 1950). Posteriormente, diversos estudos foram desenvolvidos sobre essa temática, particularmente através da medida da variabilidade da FC (VFC) que é um método não invasivo altamente utilizado para analisar a modulação autonômica cardíaca (Task Force, 1996), sendo considerado um forte preditor de mortalidade (Koopman *et al.*, 2015; Galinier *et al.*, 2000; La Rovere *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 1996; Bigger *et al.*, 1992; Ewing, 1991; Rich *et al.*, 1988; Kleiger *et al.*, 1987).

Nossa hipótese é que as oscilações hormonais decorrentes das diferentes fases do CM podem modificar o controle autonômico cardíaco no repouso e na transição repouso-exercício em mulheres que não utilizam CO, e que essas modificações serão atenuadas em usuárias de CO. Para testar essa hipótese, três estudos específicos foram desenvolvidos.

## **1 OBJETIVO**

### **1.1 Objetivo geral**

Verificar a influência do CM e o uso de CO no controle autonômico cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício de mulheres saudáveis.

### **1.2 Objetivos específicos**

a) Verificar, através de uma revisão sistematizada, a influência das diferentes fases do CM na VFC de mulheres saudáveis (Estudo 1).

b) Verificar a influência do CM na VFC de mulheres saudáveis que utilizam CO (Estudo 2).

c) Verificar a influência das diferentes fases do CM e o uso de CO na retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício (Estudo 3).

## 2 ESTUDO 1

### Artigo de revisão

#### **Influência do ciclo menstrual na variabilidade da frequência cardíaca em repouso: uma revisão sistemática**

Influence of menstrual cycle on resting heart rate variability: a systematic review

André L. Teixeira<sup>a,b</sup>

Plinio S. Ramos<sup>b</sup>

Djalma R. Ricardo<sup>b</sup>

a - Programa de pós-graduação em Ciências do Exercício e do Esporte, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (PPGCEE/UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

b - Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus (HMTJ), Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA), Juiz de Fora, MG, Brasil.

**Título resumido:** Controle autonômico e ciclo menstrual

**Intenção de submissão**

**Periódico:** Psychophysiology

**Qualis Capes:** A1

**Fator de impacto:** 2.986

## Objetivo

Determinar, por meio de uma revisão sistematizada, a influência das diferentes fases do CM na VFC em repouso de mulheres saudáveis.

## Métodos

### Estratégias de pesquisa

Foram analisados os mais relevantes estudos publicados originalmente na língua inglesa nos últimos 15 anos (entre janeiro de 2000 a dezembro de 2014), utilizando a base de dados *MedLine (National Library of Medicine)* via *PubMed*. Como estratégia de busca utilizou-se a seguinte frase de pesquisa: (“*menstrual cycle*” OR “*menstrual cycles*” OR “*endometrial cycle*” OR “*endometrial cycles*” OR “*ovarian cycle*” OR “*ovarian cycles*” OR “*luteal phase*” OR “*secretory phase*” OR “*menstrual secretory phase*” OR “*postovulatory phase*” OR “*follicular phase*” OR “*proliferative phase*” OR “*menstrual proliferative phase*” OR “*preovulatory phase*” OR *ovulation* OR *ovulations* OR “*ovarian hormone*” OR “*ovarian hormones*”) AND (“*cardiac autonomic control*” OR “*autonomic nervous system*” OR “*autonomic nervous control*” OR “*heart rate variability*” OR “*heart rate*” OR “*heart rate control*” OR “*parasympathetic nervous system*” OR “*sympathetic nervous system*”).

A seleção dos artigos foi realizada respeitando-se quatro etapas. Na primeira, foi aplicado os filtros disponibilizados na própria base do *PubMed*, sendo excluídos: a) os estudos publicados antes de janeiro de 2000; b) os estudos realizados em modelo animal; e c) os estudos que não estavam escritos na língua inglesa. Na segunda etapa, foi realizada a leitura dos títulos, sendo excluídos aqueles que não se enquadravam em qualquer dos critérios de inclusão do estudo. Na terceira etapa, foi realizada a leitura dos resumos dos estudos selecionados e, da mesma forma, foram excluídos aqueles que não se adequavam pelo menos a um dos critérios de inclusão. Por fim, todos os estudos não excluídos nas etapas anteriores foram lidos na íntegra para seleção dos que seriam incluídos nesta revisão. Caso não fosse possível o acesso a algum artigo na íntegra, um e-mail foi enviado para um dos autores solicitando o manuscrito.

Os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados de maneira livre e independente por dois revisores com experiência prévia na temática, que julgaram os estudos a partir de cada item apresentado no Quadro 1. Caso alguma

divergência nas análises dos trabalhos ocorresse, a mesma era resolvida em uma reunião de consenso.

Quadro 1. Critérios de inclusão e exclusão aplicados e resultados analisados.

| Critérios de Inclusão                                              |                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Delineamento                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ensaios clínicos</li> <li>• estudos descritivos</li> <li>• artigos de revisão</li> <li>• revisões sistematizadas com ou sem metanálise</li> </ul>                                     |
| Amostra                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• adultos (acima de 18 anos)</li> <li>• saudáveis</li> <li>• eumenorréicas</li> </ul>                                                                                                   |
| Intervenção                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• determinação das fases menstruais por análise hormonal ou teste de ovulação</li> </ul>                                                                                                |
| Idioma                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• somente na língua inglesa</li> </ul>                                                                                                                                                  |
| Critérios de Exclusão                                              |                                                                                                                                                                                                                                |
| Delineamento                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• comunicações breves</li> <li>• relatos de caso</li> <li>• editoriais</li> </ul>                                                                                                       |
| Amostra                                                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• modelo animal</li> <li>• sem controle do uso de contraceptivos</li> <li>• com doença cardiovascular</li> </ul>                                                                        |
| Intervenção                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• fases menstruais auto-referida</li> <li>• fatores de confusão (ex. tabagismo; tratamento farmacológico)</li> <li>• intervenções pouco claras, mal descritas ou inadequadas</li> </ul> |
| Forma de publicação                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• somente em resumo</li> </ul>                                                                                                                                                          |
| Resultados analisados                                              |                                                                                                                                                                                                                                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC em repouso</li> </ul> |                                                                                                                                                                                                                                |

## Resultados

Foram identificados 589 estudos através da pesquisa inicial no banco de dados. Ao aplicar os primeiros filtros de pesquisa excluindo os estudos publicados antes de janeiro de 2000, aqueles realizados em modelo animal, bem como os que não estavam na língua inglesa, restaram 248 evidências. Contudo, após a aplicação de todos os critérios de inclusão/exclusão, apenas 12 estudos fizeram parte do escopo desta revisão. A Figura 1 apresenta o fluxograma da seleção dos artigos utilizados na presente pesquisa.

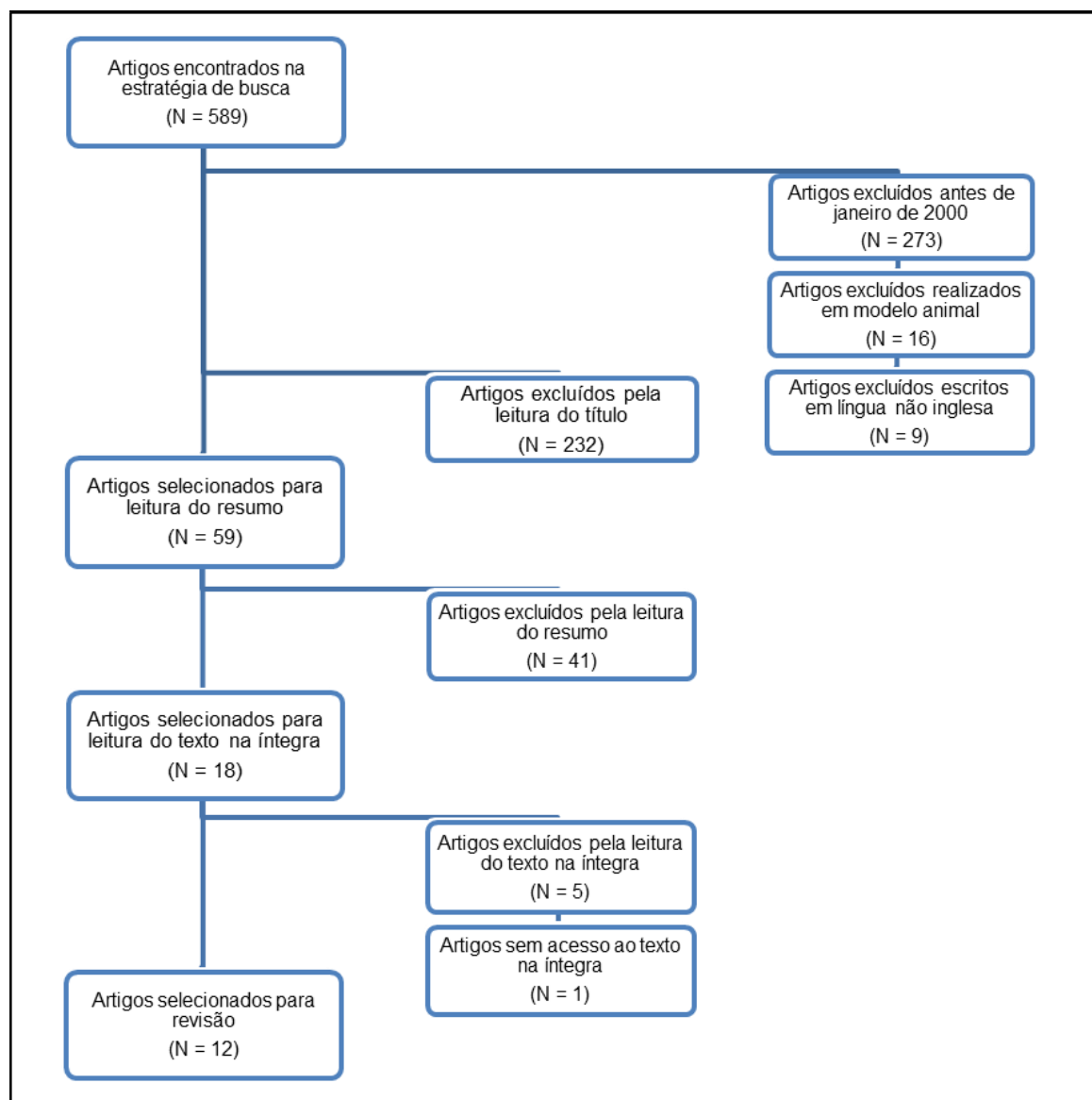


Figura 1. Fluxograma dos artigos selecionados.

Os estudos analisados envolveram 288 mulheres com idade variando entre 18 a 44 anos. Percebe-se que não há um consenso na literatura em relação à definição das fases menstruais. A maioria dos estudos comparou apenas as fases folicular e lútea do CM, outros acrescentaram a fase ovulatória, e ainda, alguns autores dividiram o CM em cinco fases distintas. Além disso, alguns estudos utilizaram além da VFC em repouso, outros testes autonômicos como a sensibilidade barorreflexa, a reatividade cardiovascular desencadeada por estresse físico, térmico ou mental, entre outros. No entanto, para o escopo desta revisão, foram analisados apenas os resultados da VFC em repouso.

A Tabela 1 apresenta o sumário dos estudos e seus principais resultados. Percebe-se que, a maioria dos estudos encontrou diferenças significativas na VFC em repouso durante as diferentes fases do CM, demonstrando uma predominância da atividade vagal cardíaca na fase folicular e um aumento da atividade simpática na fase lútea do CM. Contudo, alguns autores não tiveram êxito em encontrar diferenças na VFC ao longo do CM. Em adendo, nenhuma metanálise ou revisão sistematizada foi identificada sobre a temática.

Tabela 1. Sumário dos estudos e seus principais resultados.

| Estudo                            | Métodos                                                                                                            |                                                                                                                 | Resultados                                                                      |                         |                                                                                 |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | Amostra                                                                                                            | Teste autonômico                                                                                                | Folicular                                                                       | Ovulatória              | Lútea                                                                           |
| Hirshoren <i>et al.</i><br>(2002) | 8 mulheres<br>(21 a 40 anos)                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• FC e PA</li> <li>• VFC</li> <li>• Sensibilidade baroreflexa</li> </ul> | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| Yildirim <i>et al.</i><br>(2002)  | 43 mulheres<br>(20 a 38 anos)                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> </ul>                                                         | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| Cankar e Finderle<br>(2003)       | 10 mulheres<br>(35 ± 2 anos)                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• FC e PA</li> <li>• VFC</li> <li>• Estresse térmico</li> </ul>          | ↔ vagal<br>↔ simpático                                                          | -                       | ↔ vagal;<br>↔ simpático                                                         |
| Leicht <i>et al.</i><br>(2003)    | 10 mulheres<br>(25 ± 2 anos)                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> </ul>                                                         | ↔ vagal<br>↔ simpático                                                          | ↔ vagal;<br>↔ simpático | ↔ vagal;<br>↔ simpático                                                         |
| Vallejo <i>et al.</i><br>(2005)   | 30 mulheres<br>(21 a 35 anos)                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC de 24 horas</li> </ul>                                             | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| Schueller <i>et al.</i><br>(2006) | 27 mulheres sem CO<br>31 mulheres com CO                                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> <li>• Sensibilidade baroreflexa</li> </ul>                    | ↔ vagal<br>↔ simpático                                                          | -                       | ↔ vagal;<br>↔ simpático                                                         |
| Matsumoto <i>et al.</i><br>(2007) | Grupo 1: 28 mulheres sem SPM<br>Grupo 2: 23 mulheres com SPM<br>Grupo 3: 11 mulheres com TDPM<br>(26,9 ± 1,0 anos) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> </ul>                                                         | (grupos 1 e 3)<br>↔ vagal<br>↔ simpático<br>(grupo 2)<br>↑ vagal<br>↓ simpático | -<br><br>-              | (grupos 1 e 3)<br>↔ vagal<br>↔ simpático<br>(grupo 2)<br>↓ vagal<br>↑ simpático |
| Baker <i>et al.</i><br>(2008)     | Grupo 1: 12 mulheres sem SPM<br>Grupo 2: 9 mulheres com SPM<br>(18 a 40 anos)                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC durante o sono</li> </ul>                                          | (grupos 1)<br>↔ vagal<br>↔ simpático<br>(grupo 2)<br>↑ vagal<br>↓ simpático     | -<br><br>-              | (grupos 1)<br>↔ vagal<br>↔ simpático<br>(grupo 2)<br>↓ vagal<br>↑ simpático     |
| Bai <i>et al.</i><br>(2009)       | 16 mulheres<br>(23,8 ± 2,7 anos)                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> </ul>                                                         | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| McKinley <i>et al.</i><br>(2009)  | 49 mulheres<br>(19 a 44 anos)                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC de 24 horas</li> </ul>                                             | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| Zambotti <i>et al.</i><br>(2013)  | Grupo 1: 14 mulheres sem SPM<br>(31,3 ± 6,0 anos)<br>Grupo 2: 12 mulheres com SPM<br>(32,7 ± 5,8 anos)             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC durante o sono</li> </ul>                                          | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | -                       | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |
| Tenan <i>et al.</i><br>(2014)     | 13 mulheres<br>(20 a 31 anos)                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• VFC</li> </ul>                                                         | ↑ vagal<br>↓ simpático                                                          | ↔ vagal;<br>↔ simpático | ↓ vagal;<br>↑ simpático                                                         |

↑: maior atividade; ↓: menor atividade; ↔: sem diferenças; CO: contraceptivos orais; SPM: síndrome pré-menstrual; TDPM: transtorno disfórico pré-menstrual; FC: frequência cardíaca; PA: pressão arterial; VFC: variabilidade da frequência cardíaca.

### 3 ESTUDO 2

#### Artigo original

#### **Variabilidade de frequência cardíaca durante o ciclo menstrual em mulheres jovens que utilizam contraceptivos**

Heart rate variability across the menstrual cycle in young women taking oral contraceptives

André L. Teixeira<sup>a,b</sup>

Plínio S. Ramos<sup>a</sup>

Lauro C. Vianna<sup>c</sup>

Djalma R. Ricardo<sup>a</sup>

a - Maternity Hospital Therezinha de Jesus. Faculty of Medical and Health Sciences - SUPREMA - Juiz de Fora, MG, Brazil.

b - Postgraduate program in Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

c - Faculty of Physical Education, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Running title: Autonomic modulation and oral contraceptives

#### **Artigo publicado**

**Periódico:** Psychophysiology

**Qualis Capes:** A1

**Fator de impacto:** 2.986

## **Objetivo**

Verificar a influência do CM na VFC em mulheres saudáveis que utilizam CO.

## **Métodos**

### **Participantes**

17 mulheres aparentemente saudáveis (média  $\pm$  desvio padrão [mín – máx]) (idade  $24,4 \pm 3,7$  [19 – 31] anos; massa corporal  $59,1 \pm 5,5$  [52,0 – 70,4] kg; estatura  $163,7 \pm 4,7$  [158,0 – 172,0] cm) fizeram parte da amostra. Todas utilizavam CO monofásico por um período mínimo de seis meses, que possuíam uma dosagem de 0,020 a 0,035 mg de etinil estrogênio e uma baixa dosagem de progestina por 21 dias e um intervalo de sete dias. Como critério de inclusão, todas deviam ser eumenorreicas, assintomáticas, não fumantes, normotensas, não diabéticas, não obesas (índice de massa corporal entre 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>), fisicamente ativas (atividade física habitual por seis meses consecutivos com uma frequência mínima de três dias por semana e tempo maior ou igual a 30 minutos), além de não utilizarem qualquer tipo de medicamento que pudesse interferir nos procedimentos experimentais, com exceção das pílulas contraceptivas.

Todas as voluntárias foram orientadas sobre a pesquisa e, após concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (protocolo número 276.778) de acordo com a Declaração de Helsinki.

### **Fases menstruais**

Inicialmente, cada participante preencheu um formulário sobre seu histórico menstrual em relação aos últimos dois meses. As voluntárias realizaram duas visitas ao laboratório de maneira randomizada, sendo uma durante a fase de baixa dosagem hormonal exógena (LH) (média  $\pm$  DP:  $3,6 \pm 1,5$  dias após a última pílula da cartela), e uma durante a fase ativa da cartela de CO (HH) ( $21,5 \pm 1,0$  dias após o início da menstruação).

As fases menstruais foram confirmadas pela análise dos níveis séricos de estradiol e progesterona. Para isso, uma amostra de 5 ml de sangue foi recolhida da veia antecubital e centrifugada a 5000 rpm durante cinco minutos a 4°C e os hormônios foram analisados através da técnica de eletroquimioluminescência (Architect Plus, I 2000, Abbot Diagnostics, USA).

As voluntárias iniciaram o estudo de maneira aleatória em relação às fases menstruais, sendo que sete mulheres iniciaram na fase LH e 10 mulheres na fase HH.

#### Variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

A VFC foi determinada de acordo com as diretrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia e da Sociedade Norte-Americana de Marca-Passos e Eletrofisiologia (1996). Os eletrodos descartáveis foram posicionados na derivação CC5 ou CM5, sendo que o eletrocardiograma foi registrado com uma frequência de amostragem de 1.000 Hz e os dados processados usando o software PowerLab (LabChart 7 Pro; ADInstruments, Austrália). Foram analisados somente segmentos sem ruído. Todos os batimentos ectópicos foram identificados automaticamente e manualmente e excluídos da análise.

As seguintes medidas no domínio do tempo foram calculadas: a) o desvio padrão de todos os intervalos RR (SDNN), b) o percentual de intervalos RR consecutivos que apresentaram diferença maior que 50 ms (pNN50), e c) a raiz quadrada da média das diferenças ao quadrado dos sucessivos intervalos RR normais (rMSSD). A análise no domínio da frequência foi realizada utilizando a Transformada Rápida de Fourier sob as seguintes bandas de frequência: baixa frequência (LF) (0,04-0,15 Hz) e alta frequência (HF) (0,15-0,4 Hz) em valores absolutos ( $\text{ms}^2$ ) e em unidades normalizadas (nu). A razão entre LF e HF (LF/HF) também foi calculada como uma medida do balanço autonômico.

#### Protocolo experimental

Inicialmente, amostras sanguíneas foram obtidas para análise hormonal e confirmação das fases menstruais. Para caracterização da amostra, foi verificado o peso e a estatura através de uma balança digital Filizolla® e um estadiômetro com

precisão milimétrica Sanny® respectivamente, possibilitando assim o cálculo do índice de massa corporal (IMC).

As voluntárias foram orientadas a não consumirem cafeína, álcool ou qualquer estimulante cardiovascular, bem como não realizarem exercício físico nas 24 horas antecedentes aos testes. Para evitar possíveis variações do ciclo circadiano, todas foram avaliadas no mesmo horário do dia, em uma sala silenciosa e com a temperatura controlada (24°C).

A VFC em repouso foi obtida por um eletrocardiograma (CC5 ou CM5) utilizando o sistema PowerLab (4/25T PowerLab e software Lab Chart Pro 7; ADInstruments, Austrália), sendo que as participantes permaneceram de repouso na posição supina durante 20 minutos. As medidas foram determinadas durante os 10 minutos finais, sendo que os 10 minutos iniciais foram utilizados para garantir a estabilização da frequência cardíaca. Durante o período de registro, as voluntárias foram instruídas a manter uma frequência respiratória de 15 ciclos por minuto seguindo o sinal sonoro de um metrônomo.

### Análise estatística

Para a análise estatística, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como os dados apresentaram distribuição normal foi utilizada uma estatística paramétrica. Para verificar diferenças entre os grupos nas características demográficas foi utilizado o teste *t* de Student. Os dados foram analisados através dos pacotes estatísticos SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) e Prism (Graphpad, versão 5.01, USA) com nível de significância de  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

Os valores hormonais e hemodinâmicos estão apresentados na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas entre as fases LH e HH na frequência cardíaca e pressão arterial ( $P > 0,05$ ). Os níveis plasmáticos de estradiol (LH:  $19,8 \pm 4,2$  pg/mL vs. HH:  $12,4 \pm 1,5$  pg/mL;  $P = 0,06$ ), e progesterona (LH:  $0,247 \pm 0,58$  ng/mL vs. HH:  $0,371 \pm 0,08$  ng/mL;  $P = 0,22$ ) (média  $\pm$  erro padrão) foram similares em ambas as fases.

Tabela 2. Valores hormonais e hemodinâmicos.

|                      | LH          | HH          | <i>P</i> |
|----------------------|-------------|-------------|----------|
| FC (bpm)             | 70,7 ± 2,8  | 71,8 ± 2,4  | 0,28     |
| PAS (mm Hg)          | 111,1 ± 2,4 | 108,0 ± 3,0 | 0,13     |
| PAD (mm Hg)          | 71,3 ± 1,6  | 68,6 ± 1,6  | 0,08     |
| PAM (mm Hg)          | 84,5 ± 1,7  | 81,7 ± 1,9  | 0,08     |
| Estradiol (pg/mL)    | 22,8 ± 4,2  | 12,4 ± 1,5  | 0,06     |
| Progesterona (ng/mL) | 0,829 ± 0,6 | 0,371 ± 0,1 | 0,22     |

FC: frequência cardíaca. PAS: pressão arterial sistólica. PAD: pressão arterial diastólica. PAM: pressão arterial média. *P*: nível de significância ( $P < 0,05$ ).

A Tabela 3 mostra que os índices da VFC no domínio do tempo não variaram de acordo com as diferentes fases do CM ( $P > 0,05$ ).

Tabela 3. VFC no domínio do tempo.

|                       | LH             | HH             | <i>P</i> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------|
| SDNN (ms)             | 68,6 ± 6,0     | 65,4 ± 4,6     | 0,22     |
| TP (ms <sup>2</sup> ) | 4945,5 ± 890,8 | 4631,6 ± 737,2 | 0,30     |
| pNN50 (ms)            | 259,8 ± 32,6   | 253,5 ± 28,0   | 0,42     |
| rMSSD (ms)            | 67,8 ± 8,6     | 57,9 ± 4,9     | 0,08     |

TP: potência total. *P*: nível de significância ( $P < 0,05$ ).

A Figura 2 apresenta os valores da VFC no domínio da frequência. Os componentes LF (LH:  $756,4 \pm 178,9 \text{ ms}^2$  vs. HH:  $834,0 \pm 211,0 \text{ ms}^2$ ,  $P = 0,27$ ) e HF (LH:  $2522,6 \pm 510,6 \text{ ms}^2$  vs. HH:  $1926,1 \pm 282,3 \text{ ms}^2$ ,  $P = 0,09$ ) não foram significativamente diferentes entre as fases menstruais. De maneira semelhante, não houve diferenças significativas entre as diferentes fases para os componentes LF (nu) (LH:  $24,8 \pm 3,4$  vs. HH:  $27,0 \pm 3,7$ ;  $P = 0,26$ ), e HF (nu) (LH:  $69,9 \pm 3,5$  vs. HH:  $69,1 \pm 3,6$ ;  $P = 0,40$ ).

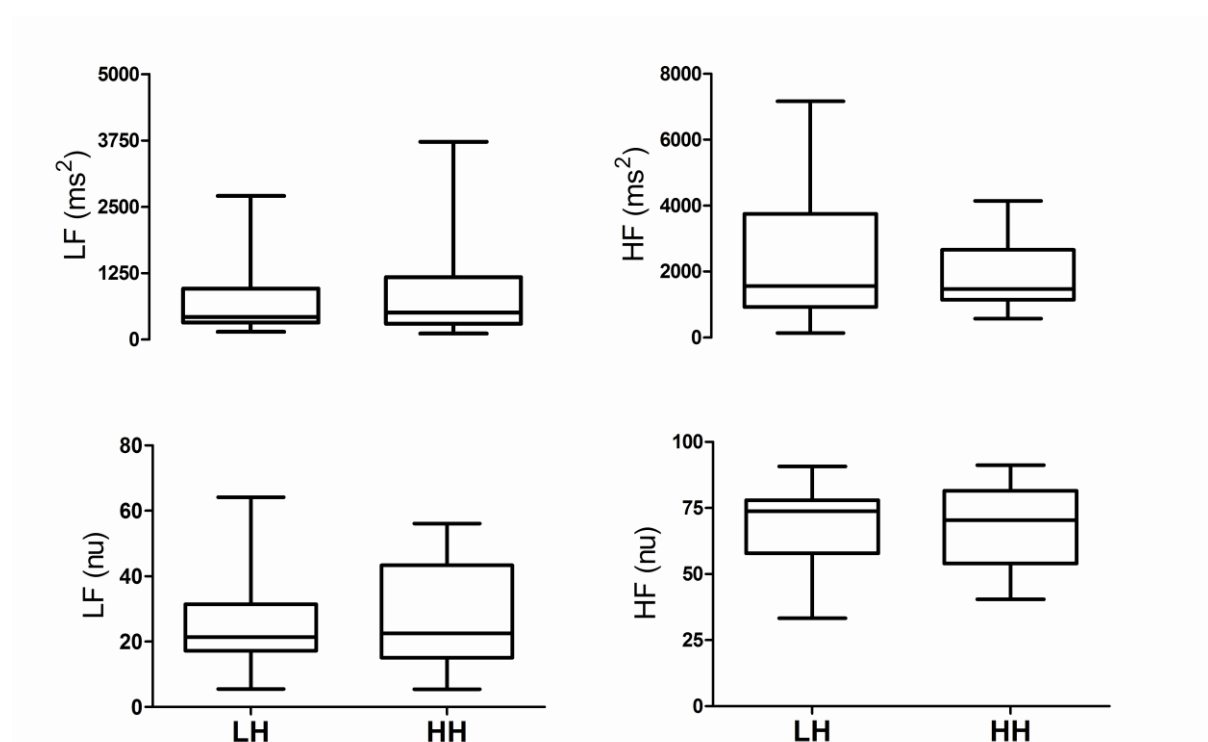


Figura 2. Índices da VFC no domínio da frequência. LF: baixa frequência (0,04-0,15 Hz). HF: alta frequência (0,15-0,4 Hz).

A Figura 3 demonstra a razão LF/HF. Não foram observadas diferenças significativas entre as fases LH e HH ( $0,431 \pm 0,11$  vs.  $0,468 \pm 0,09$ , respectivamente,  $P = 0,37$ , média  $\pm$  erro padrão).

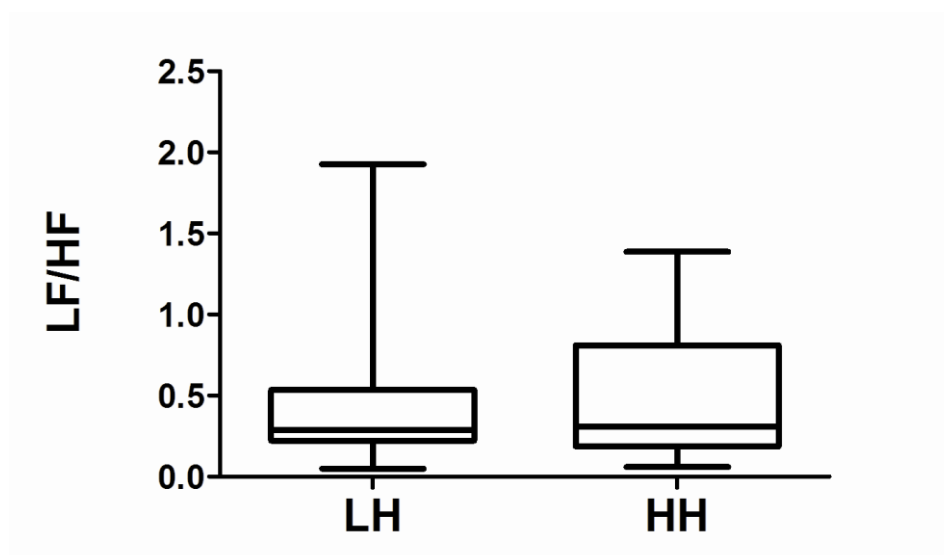


Figura 3. Razão entre os componentes de baixa e alta frequência (LF/HF).

## 4 ESTUDO 3

### Artigo original

#### **Efeito dos hormônios ovarianos e das pílulas contraceptivas na retirada vagal cardíaca no início do exercício dinâmico**

Effects of ovarian hormones and oral contraceptive pills on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise

André L. Teixeira<sup>a,b</sup>

Plínio S. Ramos<sup>a</sup>

Lauro C. Vianna<sup>c</sup>

Djalma R. Ricardo<sup>a</sup>

a - Maternity Hospital Therezinha de Jesus. Faculty of Medical and Health Sciences (SUPREMA), Juiz de Fora, MG, Brazil.

b - Postgraduate program in Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

c - Faculty of Physical Education, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil.

**Running title:** Autonomic modulation and oral contraceptives

### Artigo publicado

**Periódico:** PLoS One

**Qualis:** A1

**Fator de impacto:** 3.234

## **Objetivo**

Verificar a influência das diferentes fases do CM e o uso de CO na retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício

## **Métodos**

### Procedimentos éticos

Todas as participantes foram orientadas sobre a pesquisa e, após concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (protocolo número 276.778) de acordo com a Declaração de Helsinki. Todas participaram da pesquisa de maneira voluntária, sem receber nenhum tipo de incentivo financeiro.

### Amostra

Um total de 30 mulheres aparentemente saudáveis com idade entre 19 e 32 anos (média  $\pm$  erro padrão: 24,7  $\pm$  0,6 anos) fizeram parte da amostra. As participantes foram divididas em dois grupos de acordo com a utilização de CO: não usuárias de CO (No OCP, n = 13) e usuárias de CO (OCP, n = 17). Como critério de inclusão, todas deviam ser eumenorreicas, assintomáticas, não fumantes, normotensas, não diabéticas, não obesas (índice de massa corporal entre 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>), fisicamente ativas (atividade física habitual por seis meses consecutivos com uma frequência mínima de três dias por semana e tempo maior ou igual a 30 minutos), além de não utilizarem qualquer tipo de medicamento que pudesse interferir nos procedimentos experimentais, com exceção das pílulas contraceptivas no grupo OCP.

As voluntárias no grupo OCP utilizavam CO monofásico por um período mínimo de seis meses, que possuíam uma dosagem de 0,020 a 0,035 mg de etinil estrogênio e uma dosagem baixa de progestina por 21 dias e um intervalo de 7 dias.

### Fases menstruais

Inicialmente, as voluntárias responderam um questionário para verificar a regularidade menstrual durante dois ciclos menstruais consecutivos. Todas foram avaliadas nas três diferentes fases do CM: folicular, entre os dias 1 e 5 do CM (dia  $3,6 \pm 1,2$ ); ovulatória, entre os dias 13 e 16 (dia  $14,3 \pm 0,8$ ); e lútea entre os dias 20 e 24 (dia  $21,3 \pm 0,8$ ). As fases menstruais foram confirmadas pela análise dos níveis séricos de estradiol e progesterona. Para isso, uma amostra de 5 ml de sangue foi recolhida da veia antecubital e centrifugada a 5000 rpm durante cinco minutos a 4°C e os hormônios foram analisados através da técnica de eletroquimioluminescência (Architect Plus, I 2000, Abbot Diagnostics, USA).

As voluntárias iniciaram o estudo de maneira aleatória em relação às fases menstruais, sendo que 12 mulheres (6 não usuárias de CO) iniciaram na fase folicular, 10 (4 não usuárias de CO) na fase ovulatória, e 8 (3 não usuárias de CO) na fase lútea do CM.

### Retirada vagal cardíaca

Para análise da retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício foi utilizado o teste de exercício de quatro segundos (T4s). Originalmente proposto por Araújo *et al.* (1989), o T4s é um procedimento validado farmacologicamente (Araújo *et al.*, 1992) e altamente reprodutível (Araújo *et al.*, 2003) para analisar a integridade do ramo parassimpático do sistema nervoso autônomo através do transiente inicial da FC. O T4s consiste em pedalar, o mais rápido possível, um ciclo ergômetro sem carga, do 5º ao 9º segundo de uma apnéia inspiratória máxima de 12 segundos.

A atividade vagal cardíaca é determinada através do índice vagal cardíaco (IVC). O primeiro passo para o cálculo do IVC é a identificação do último intervalo RR do período pré-exercício ou o primeiro do período de exercício (aquele que for o mais longo) denominado RRB, e o mais curto intervalo RR durante o exercício (geralmente o último) denominado RRC. O IVC é obtido pela razão RRB/RRC (Araújo *et al.*, 1989; Araújo *et al.*, 1992; Araújo *et al.*, 2003). Foi utilizado o ECG de uma derivação (CM5 ou CC5) (ErgoPC Elite, Versão 3.3.4.3, Micromed, Brasília, Brasil) para o registro dos intervalos RR durante todos os procedimentos.

As participantes realizaram três tentativas do T4s com intervalo de um a dois minutos. A primeira tentativa foi utilizada como forma de adaptação sendo

considerado como representativo do IVC o maior valor atingido nas duas tentativas subsequentes (Araújo *et al.*, 2003). Para cada teste foram dados quatro comandos das ações a serem realizadas a cada quatro segundos: 1) inspiração máxima e rápida, primariamente pela boca; 2) pedalar o mais rápido possível; 3) parada brusca da pedalada e 4) expiração. A figura 4 representa o cálculo do IVC através do traçado do ECG em uma das participantes da amostra.

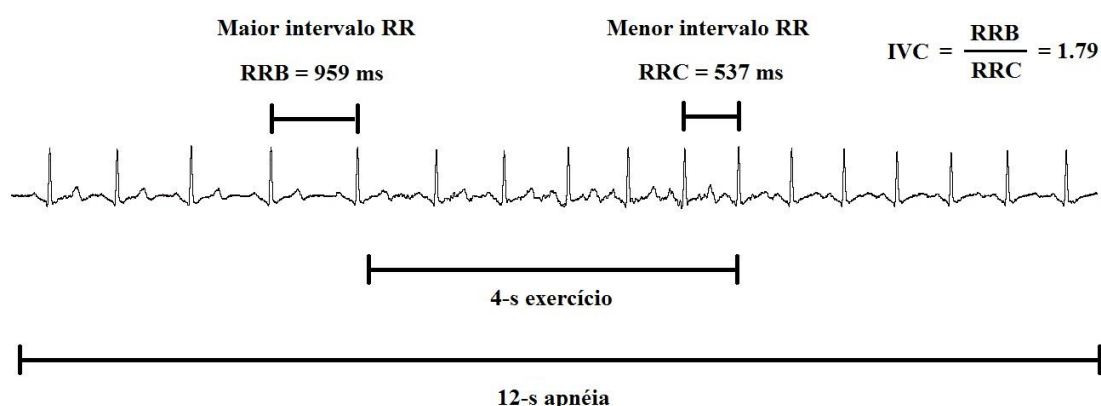


Figura 4. Cálculo do índice vagal cardíaco (IVC) durante o T4s em uma das participantes.

#### Protocolo experimental

Inicialmente, amostras sanguíneas foram obtidas para análise hormonal e confirmação das fases menstruais. Para caracterização da amostra, foi verificado o peso e a estatura através de uma balança digital Filizolla® e um estadiômetro com precisão milimétrica Sanny® respectivamente, possibilitando assim o cálculo do índice de massa corporal (IMC).

As voluntárias foram orientadas a não consumirem cafeína, álcool ou qualquer estimulante cardiovascular, bem como não realizarem exercício físico nas 24 horas antecedentes aos testes. Para evitar possíveis variações do ciclo circadiano, todas foram avaliadas no mesmo horário do dia, em uma sala silenciosa e com a temperatura controlada (24°C).

A FC em repouso foi obtida por um ECG (CC5 ou CM5) utilizando o sistema PowerLab (4/25T PowerLab e software Lab Chart Pro 7; ADInstruments, Austrália), e a pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram determinadas pelo método auscultatório (BD<sup>®</sup>, Brasil). Para isso, as voluntárias permaneceram em repouso na posição supina durante 20 minutos e as medidas foram determinadas durante os 10 minutos finais. Os 10 minutos iniciais foram utilizados para garantir a estabilização da FC. Durante o período de registro, as voluntárias foram instruídas a manter uma frequência respiratória de 15 ciclos por minuto seguindo o sinal sonoro de um metrônomo. Após as análises em repouso, as voluntárias realizaram o T4s.

### Análise estatística

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e igualdade de variância pelo critério de Levene. Como os dados apresentaram distribuição normal foi utilizada uma estatística paramétrica. Para verificar diferenças entre os grupos nas características demográficas foi utilizado o teste *t* de Student. Uma ANOVA 2 x 3 (grupos x fases menstruais) com medidas repetidas foi utilizada para comparar os níveis hormonais e os valores do T4s entre os grupos nas diferentes fases do CM. O teste de *post hoc* de Bonferroni foi utilizado para detectar as diferenças quando necessário. Os dados foram analisados através dos pacotes estatísticos SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) e Prism (Graphpad, versão 5.01, USA) com nível de significância de  $P < 0,05$ .

## **Resultados**

As características descritivas das participantes estão demonstradas na tabela 4. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação a idade, medidas antropométricas e a idade da menarca ( $P > 0,05$ ).

Tabela 4. Dados descritivos da amostra.

|                          | No OCP (n = 13) | OCP (n = 17) | <i>P</i> |
|--------------------------|-----------------|--------------|----------|
| Idade (anos)             | 25 ± 1          | 24 ± 1       | 0,55     |
| Massa corporal (kg)      | 57,5 ± 1,8      | 59,1 ± 1,3   | 0,46     |
| Estatura (m)             | 1,62 ± 0,02     | 1,64 ± 0,01  | 0,26     |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> ) | 22,0 ± 0,5      | 22,0 ± 0,3   | 0,99     |
| Menarca (anos)           | 12,5 ± 0,3      | 12,5 ± 0,2   | 0,85     |

Valores apresentados em média ± erro padrão. No OCP: não usuárias de CO. OCP: usuárias de CO. IMC: índice de massa corporal. *P*: nível de significância ( $P < 0.05$ ).

A figura 5 apresenta os níveis plasmáticos de estradiol e progesterona nas diferentes fases do CM. Como esperado, no grupo sem a utilização de CO os níveis de estradiol estavam baixos na fase folicular ( $31,3 \pm 2,6$  pg/ml) e aumentaram nas fases ovulatória ( $130,6 \pm 22,2$  pg/ml) e lútea ( $108,8 \pm 12,3$  pg/ml) ( $P < 0,05$ ). Os níveis de progesterona mantiveram-se baixos nas fases folicular ( $0,22 \pm 0,02$  ng/ml) e ovulatória ( $0,59 \pm 0,26$  ng/ml), obtendo seu pico na fase lútea ( $6,58 \pm 1,45$  ng/ml) ( $P < 0,05$ ). Já para o grupo que utilizavam CO os níveis plasmáticos de estradiol (folicular:  $22,8 \pm 4,2$  pg/ml; ovulatória:  $11,6 \pm 0,7$  pg/ml; lútea:  $12,3 \pm 1,5$  pg/ml;  $P > 0,05$ ) e progesterona (folicular:  $0,83 \pm 0,58$  ng/ml; ovulatória:  $0,41 \pm 0,09$  ng/ml; lútea:  $0,37 \pm 0,08$  ng/ml;  $P > 0,05$ ) mantiveram-se constantes ao longo do CM.

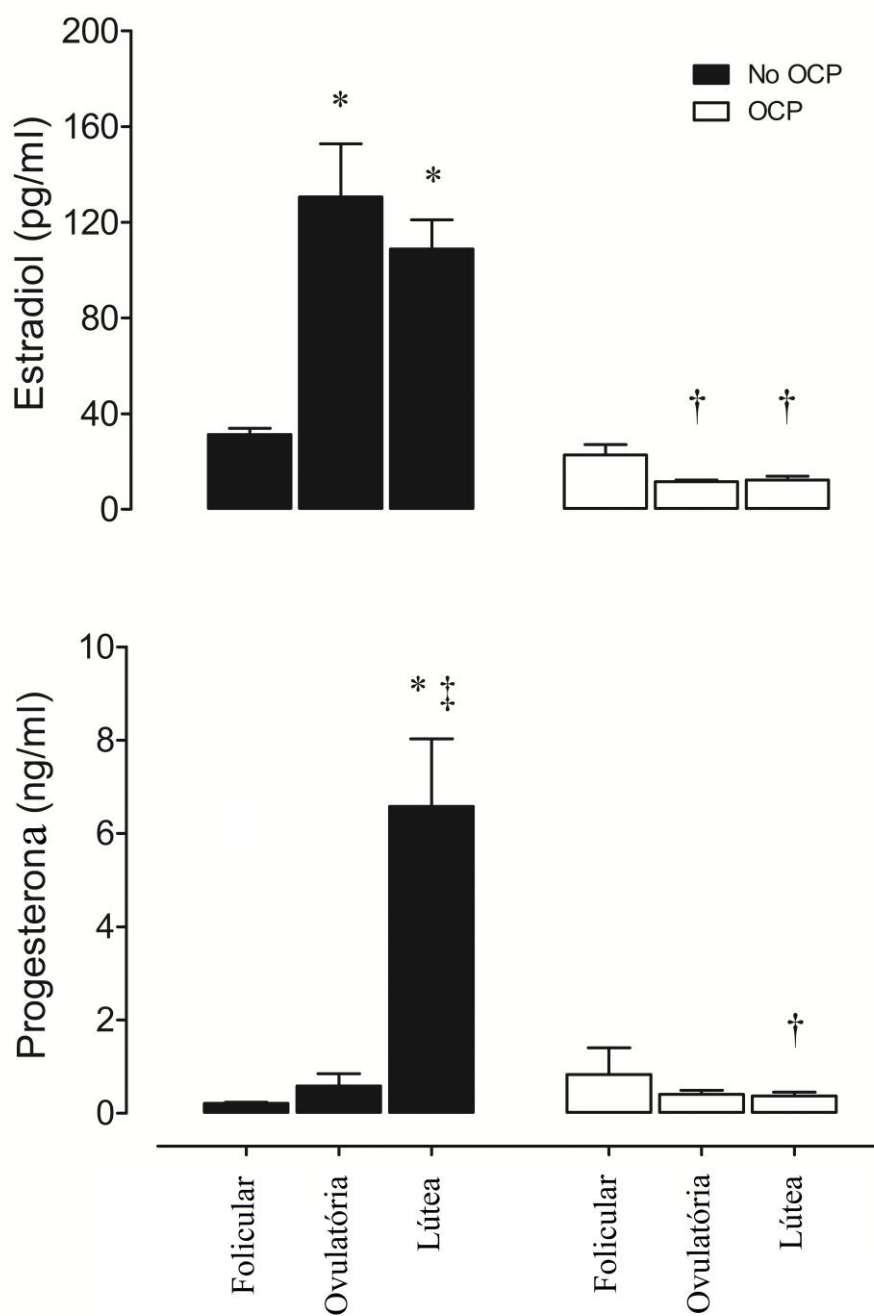


Figura 5. Níveis de estradiol (acima) e progesterona (abaixo) entre os grupos de usuárias (OCP) e não usuárias (No OCP) de CO durante o CM. \*Diferença significativa ( $P < 0.001$ ) para a fase folicular. † Diferença significativa ( $P < 0.001$ ) entre os grupos na mesma fase do CM. ‡ Diferença significativa ( $P < 0.001$ ) para a fase ovulatória.

A figura 6 demonstra que não houve diferença significativa no IVC entre as diferentes fases do CM tanto no grupo que não utilizavam CO (folicular:  $1,58 \pm 0,1$ ; ovulatória:  $1,56 \pm 0,1$ ; lútea:  $1,58 \pm 0,1$ ,  $P > 0,05$ ) quanto no grupo de usuárias de CO (folicular:  $1,47 \pm 0,1$ ; ovulatória:  $1,49 \pm 0,1$ ; lútea:  $1,47 \pm 0,1$ ,  $P > 0,05$ ). Além disso, não houve diferenças significativas entre os grupos em cada fase menstrual ( $P > 0,05$ ; Eta squared: CM = 0,002; grupo = 0,054; interação = 0,028).

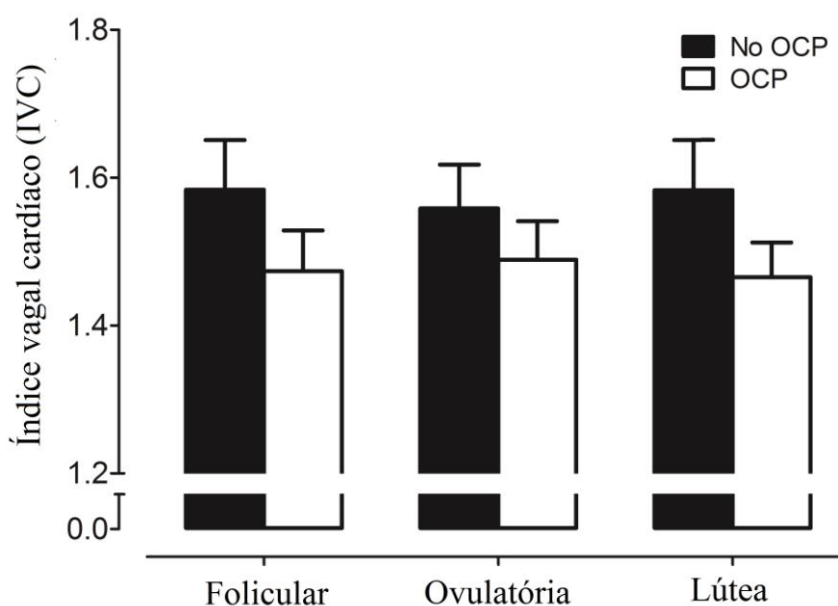


Figura 6. Retirada vagal cardíaca representada pelo IVC nas diferentes fases do CM.

Os valores de FC e pressão arterial estão apresentados na Tabela 5. A FC e a PAD não variaram de acordo com a fase do CM ou a utilização de CO ( $P > 0,05$ ). A PAS não foi influenciada pelas diferentes fases do CM tanto em usuárias quanto em não usuárias de CO ( $P > 0,05$ ). No entanto, a PAS foi significativamente maior no grupo de usuárias de CO em comparação ao grupo de não usuárias em todas as fases do CM ( $P = 0,004$ ).

Tabela 5. Valores hemodinâmicos durante o CM no grupo de usuárias (OCP) e não usuárias (No OCP) de contraceptivos.

|                |            | No OCP      | OCP          | Eta squared |       |           |
|----------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------|-----------|
|                |            |             |              | CM          | Grupo | Interação |
| FC<br>(bpm)    | Folicular  | 66,2 ± 2,1  | 70,7 ± 2,8   | 0,087       | 0,008 | 0,085     |
|                | Ovulatória | 71,8 ± 2,4  | 70,3 ± 2,0   |             |       |           |
|                | Lútea      | 70,4 ± 2,8  | 71,8 ± 2,4   |             |       |           |
| PAS<br>(mm/Hg) | Folicular  | 102,3 ± 2,0 | 111,1 ± 2,4* | 0,014       | 0,182 | 0,022     |
|                | Ovulatória | 103,5 ± 2,2 | 108,5 ± 2,0* |             |       |           |
|                | Lútea      | 102,2 ± 1,5 | 108,0 ± 3,0* |             |       |           |
| PAD<br>(mm/Hg) | Folicular  | 68,0 ± 2,0  | 71,3 ± 1,6   | 0,063       | 0,067 | 0,011     |
|                | Ovulatória | 67,1 ± 2,0  | 68,4 ± 1,5   |             |       |           |
|                | Lútea      | 65,4 ± 1,7  | 68,6 ± 1,6   |             |       |           |

Valores apresentados em médian ± erro padrão. FC: frequência cardíaca, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica. CM: ciclo menstrual. \* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos.

## DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve como objetivo verificar a influência das diferentes fases do CM e o uso de CO no controle autonômico cardíaco durante o repouso e na transição repouso-exercício. Para isso, três estudos específicos foram desenvolvidos. Os resultados demonstraram que a oscilação hormonal decorrente das diferentes fases do CM podem alterar a VFC em repouso em mulheres que não utilizam CO (Estudo 1), no entanto a utilização de CO com uma dosagem constante dos hormônios femininos não alteram a VFC (Estudo 2). Além disso, a retirada vagal cardíaca no início do exercício dinâmico não é influenciada pelo CM independente do uso de CO (Estudo 3). Esses resultados e seus possíveis mecanismos serão discutidos abaixo.

### Influência do CM na VFC em mulheres que não utilizam CO

Em nosso conhecimento, essa foi a primeira revisão sistematizada com o objetivo de verificar a influência do CM na VFC em repouso de mulheres saudáveis (Estudo 1). Os resultados demonstraram que as diferentes fases do CM podem modificar o controle autonômico cardíaco, sendo que na fase folicular os componentes da VFC que representam a atividade vagal cardíaca estão aumentados, enquanto que na fase lútea os componentes que representam a atividade simpática estão aumentados.

A medição da VFC é uma técnica não invasiva utilizada para avaliar a influência da atividade simpática e parassimpática (vagal) sobre o coração, sendo considerado um importante fator de risco cardiovascular (Koopman *et al.*, 2015; Galinier *et al.*, 2000; La Rovere *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 1996; Bigger *et al.*, 1992; Ewing, 1991; Rich *et al.*, 1988; Kleiger *et al.*, 1987). Existem dois tipos de medidas da VFC: variáveis no domínio do tempo e no domínio da frequência. No domínio do tempo, a raiz quadrada das diferenças de sucessivos intervalos RR normais (rMSSD) reflete principalmente a atividade vagal cardíaca (Bigger *et al.*, 1988; Kleiger *et al.*, 1992). O desvio padrão dos intervalos RR normais (SDNN) reflete a variabilidade total e é assumido como o mais forte prognóstico em doenças cardíacas (Task Force, 1996). As variáveis no domínio da frequência são derivadas

da análise espectral de potência de registros de longo prazo ou de curto prazo e são usadas para distinguir a predominância entre os ramos simpático e parassimpático (Akselrod *et al.*, 1981). A banda de alta frequência (HF) corresponde à arritmia sinusal respiratória e reflete, principalmente, a função vagal cardíaca (Task Force, 1996). A banda de baixa frequência (LF) é influenciada por barorreceptores de regulação da pressão arterial e reflete principalmente a atividade do ramo simpático (Akselrod *et al.*, 1981; Pomeranz *et al.*, 1985; Lindqvist, 1990). Embora controverso, a razão LF/HF tem sido utilizada para refletir o balanço simpato-vagal (Malliani *et al.*, 1991; Cacioppo *et al.*, 1994; Xhyheri *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos incluídos em nossa revisão verificou que o CM modifica o controle autonômico cardíaco, por exemplo, Hirshoren *et al.* (2002) realizaram diversos testes autonômicos incluindo a VFC em repouso, sensibilidade barorreflexa, catecolaminas circulantes, volume plasmático, entre outros, durante cinco diferentes momentos do CM (fases folicular prévia, folicular tardia, lútea prévia, lútea média e lútea tardia). Em relação à VFC, os autores demonstraram que a razão LF/HF em unidades normalizadas estava aumentada nas fases lútea prévia e lútea média em comparação à fase folicular tardia. Yildirim *et al.* (2002) avaliaram 43 mulheres durante as fase folicular e lútea do CM e não encontraram diferenças significativas na FC e nos componentes LF e HF em valores absolutos ( $\text{ms}^2$ ), no entanto, em unidades normalizadas o LF (nu) e a razão LF/HF estavam aumentados na fase lútea do CM, enquanto que o HF (nu) teve uma tendência de aumento ( $P = 0,053$ ) na fase folicular. Bai *et al.* (2009) realizaram a análise das propriedades não lineares da VFC durante as fases folicular e lútea do CM e os resultados demonstraram uma predominância dos componentes da VFC que representam a atividade vagal durante a fase folicular e uma predominância dos componentes que representam a atividade simpática durante a fase lútea. McKinley *et al.* (2009) avaliaram 49 mulheres através do ECG de 24 horas e verificaram que todos os componentes da VFC analisados (LF, HF, SDNN, rMSSD) estavam aumentados e a FC estava diminuída na fase folicular em comparação à fase lútea. Tenan *et al.* (2014) avaliaram 13 mulheres durante cinco momentos distintos do CM e verificaram que a FC aumenta enquanto que a VFC diminui após a ovulação (fase ovulatória). Todos esses estudos demonstraram que a fase folicular é caracterizada por uma predominância da atividade vagal cardíaca, enquanto que a fase lútea por um aumento da atividade simpática cardíaca.

Os mecanismos responsáveis por esses resultados são complexos. No entanto, já foi demonstrado que o estrogênio possui algumas ações cardiovasculares, sendo considerado um hormônio cardioprotetor (Mendelsohn e Karas, 1999; Xing *et al.*, 2009). O estrogênio possui tanto ações imediatas como o aumento da síntese de óxido nítrico, quanto ações em longo prazo que inibem as lesões vasculares e previnem a aterosclerose (Xing *et al.*, 2009). Nesse sentido, Weissman *et al.* (2009) demonstraram que o aumento agudo no nível de estrogênio durante um protocolo de ovulação induzida está associado com o aumento da atividade vagal cardíaca em mulheres jovens. Em contrapartida, a progesterona está associada a um aumento da atividade simpática cardíaca (Yildirim *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2009). A partir desses estudos, podemos inferir que essas ações cardiovasculares associadas aos hormônios gonadais femininos podem explicar os resultados encontrados no Estudo 1. Por outro lado, Cankar e Finderle (2003) e Leicht *et al.* (2003) verificaram que as variações hormonais decorrentes das diferentes fases do CM não estão associadas às alterações na VFC em repouso em dez mulheres saudáveis.

Essa discrepância nos resultados não está clara, porém alguns aspectos metodológicos devem ser consideradas. Por exemplo, o pequeno número amostral que variou de oito (Hirshoren *et al.*, 2002) a 49 (McKinley *et al.*, 2009) voluntárias pode ser considerado uma limitação dos estudos. Outra limitação importante é em relação às fases menstruais analisadas. A maioria dos autores utilizou apenas a fase folicular e lútea do CM, ignorando a fase ovulatória em que os níveis plasmáticos de estradiol estão aumentados enquanto que os níveis de progesterona permanecem baixos. Outro ponto importante é o tempo de medição da VFC que variou entre 5 minutos (Schueller *et al.*, 2006) e 24 horas (Vallejo *et al.*, 2005; McKinley *et al.*, 2009). Além disso, apesar da VFC ser um método altamente utilizado na comunidade científica como uma medida não invasiva do controle autonômico, os estudos quanto sua reprodutibilidade apresentam resultados bastante heterogêneos (Sandercock *et al.*, 2005; Cipryan e Litschmannova, 2013).

#### Influência do uso de CO na VFC em repouso

Os resultados do Estudo 2 demonstraram que a utilização de CO não modificam a VFC em repouso. Corroborando com esses resultados, Schueller *et al.* (2006) compararam a VFC e a sensibilidade barorreflexa entre mulheres com e sem a utilização de CO e verificaram que a VFC tanto nos domínios do tempo quanto da frequência não estão alteradas nas diferentes fases do CM em ambos os grupos. Além disso, Vallejo *et al.* (2005) avaliaram a variação circadiana da VFC nos domínios do tempo através do ECG de 24 horas e verificaram que, apesar dos valores de SDNN estarem aumentados na fase lútea e os valores de rMSSD tenderem a um aumento ( $P = 0,051$ ) durante o período menstrual, a idade e o IMC foram mais sensíveis às variações da VFC do que as diferentes fases do CM.

Esses resultados podem ser explicados devido ao fato da utilização de CO atenuarem as oscilações hormonais decorrentes das diferentes fases do CM (Figura 5). Parece que a variação dos hormônios estradiol e progesterona, que possuem ações cardiovasculares, ao longo do CM são responsáveis pelas alterações na VFC em mulheres que não utilizam CO e que essas alterações são blindadas pelo uso de CO.

Outro fator que deve ser considerado é a incidência da síndrome pré-menstrual (SPM). A SPM é caracterizada pela ocorrência repetitiva de um conjunto de alterações físicas, do humor, cognitivas e comportamentais, que interferem negativamente nas atividades diárias, com início em torno de duas semanas antes da menstruação e alívio rápido após o início do fluxo menstrual (Grady-Weliky, 2003; Teixeira *et al.*, 2013b). Alguns autores avaliaram a VFC durante o CM entre mulheres com diagnóstico positivo e negativo para SPM e verificaram que o controle autonômico cardíaco é influenciado pelo CM apenas em mulheres que possuem SPM, sendo que na fase sintomática (lútea) ocorre um aumento da atividade simpática e na fase assintomática (folicular) um aumento da atividade vagal, enquanto que, nas mulheres com diagnóstico negativo para SPM, as diferentes fases do CM não modificam a VFC (Matsumoto *et al.*, 2007; Baker *et al.*, 2008). Por outro lado, Zambotti *et al.* (2013) compararam a VFC durante o sono em mulheres com diagnóstico positivo e negativo para a SPM e verificaram uma predominância da atividade vagal cardíaca na fase folicular e uma predominância da atividade simpática na fase lútea em ambos os grupos.

Os COs além de serem utilizados para a prevenção da gravidez, eles são prescritos para algumas patologias como a síndrome dos ovários poliscísticos e

para atenuar os sintomas da SPM (Wichianpitaya *et al.*, 2013). Esses efeitos podem contribuir para justificar as alterações na VFC apenas em mulheres que não utilizam CO.

### Influência do CM e o uso de CO na retirada vagal cardíaca

O Estudo 3 foi conduzido com o objetivo de verificar a influência do CM e o uso de CO no controle autonômico cardíaco no início do exercício dinâmico. Os resultados demonstraram que as diferentes fases do CM não modificam a retirada vagal cardíaca avaliada pelo T4s independente da utilização de CO.

Embora existam vários métodos disponíveis para avaliar a atividade parassimpática cardíaca, no presente estudo foi utilizado o T4s. Este teste baseia-se no conceito de que a latência do ramo simpático é mais longa do que a do ramo parassimpático. Portanto, no início de exercício dinâmico, o aumento rápido da FC é mediado, quase que exclusivamente, por uma retirada vagal cardíaca que ocorre de maneira quase instantânea através de um reflexo neurogênico (Frageus e Linnarsson, 1976; White e Raven, 2014). Em 1992, o T4s foi validado farmacologicamente em 15 indivíduos que o tiveram uma abolição completa do aumento da FC no transiente inicial do exercício sob a infusão intravenosa de atropina (bloqueio do ramo parassimpático), enquanto que a infusão de grandes quantidades de propanolol (bloqueio do ramo simpático) não influenciou essa resposta (Araújo *et al.*, 1992). Além disso, Araújo *et al.* (2003) avaliaram a confiabilidade inter e intradia do T4s em 15 indivíduos assintomáticos submetidos ao T4s por cinco dias consecutivos (confiabilidade interdia) e, em um desses dias, os voluntários realizavam nove tentativas consecutivas do T4s (confiabilidade intradia). O IVC apresentou elevada confiabilidade inter e intradia ( $r = 0,77$ ; IC95% = 0,49-0,92 e  $r = 0,92$ ; IC95% = 0,84-0,97, respectivamente). Estudos anteriores demonstraram que a magnitude CVI não é dependente de uma execução ativa ou passiva (Nóbrega e Araújo, 1993), se o exercício é efetuado com os membros inferiores ou superiores (Silva *et al.*, 2008), ou mesmo sem o uso de cicloergômetro, na posição ortostática (Almeida *et al.*, 2004). Este protocolo simples e altamente confiável tem sido utilizado em vários estudos clínicos e fisiológicos (Nóbrega e Araújo, 1993; Knopfli e Bar-Or, 1999, Almeida *et al.*, 2004; Ricardo *et al.*, 2005;

Oliveira *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2009; Ricardo *et al.*, 2010; Vianna *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2015).

Os resultados do Estudo 3 são semelhantes aos de Matsuo *et al.* (2003), que verificaram a influência do CM no transiente inicial da FC no início do exercício. Os autores avaliaram sete mulheres que não utilizavam CO através de movimentos voluntários e passivos de extensão do joelho durante 20 segundos. Para quantificar o controle autonômico cardíaca, usaram o delta da FC ( $\Delta FC$ ) calculado pela diferença do valor absoluto dos momentos pré e pós exercício. Os resultados demonstraram que a FC aumentou de forma semelhante em ambas as fases do CM (folicular e lútea). No entanto, os autores não utilizaram a fase ovulatória do ciclo em que as concentrações de estradiol estão mais elevadas e os níveis de progesterona estão baixos. Além disso, o protocolo utilizado pelos autores não avalia apenas a retirada vagal cardíaca, pois um exercício com duração de 20 segundos também é modulado pela atividade nervosa simpática (Hollander e Bouman, 1975; Freyschuss, 1970). Os resultados do nosso terceiro estudo acrescentam os achados de Matsuo *et al.* (2003), sugerindo que, as diferentes fases do CM não modificam o controle autonômico cardíaco no início do exercício dinâmico.

Apesar do nosso estudo corroborar com o de Matsuo *et al.* (2003), esses resultados refutaram nossa hipótese inicial de que o CM iria modificar a retirada vagal cardíaca em mulheres que não utilizam CO. Essa hipótese foi criada devido ao fato dos hormônios sexuais femininos possuírem ações cardiovasculares o que poderia explicar as alterações na VFC ao longo do CM (Estudo 1). No entanto, devido ao fato do T4s avaliar quase que exclusivamente o ramo parassimpático do sistema nervoso autônomo, parece que as ações cardiovasculares relacionadas aos hormônios femininos não são capazes de modificar a retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício, pois esse mecanismo ocorre através de um reflexo neurogênico.

### Limitações dos estudos e futuras direções

Como todo estudo de caráter experimental, a presente pesquisa possui algumas limitações metodológicas que devem ser consideradas. Parece que a principal limitação é o pequeno número amostral o que pode aumentar o erro do tipo

II. De um ponto de vista mais conservador, essa amostra pode não possuir o poder estatístico para detectar alguma diferença ou interação entre as diferentes fases do CM ou entre os grupos com e sem a utilização de CO. No entanto, pela dificuldade operacional, a maioria dos estudos bem controlados sobre CM e controle autonômico cardíaco resultam em um pequeno número amostral (Tenan *et al.*, 2014; Middlekauf *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2009; Hirshoren *et al.*, 2002; Leicht *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 1995), o que não compromete seus resultados. Além disso, nós utilizamos apenas mulheres saudáveis o que limita a extrapolação dos nossos resultados para outras populações como mulheres com diagnóstico positivo para SPM, sedentárias ou com alguma doença cardiovascular. Pesquisas futuras devem ser desenvolvidas em diferentes populações e utilizando outros testes autonômicos para maiores esclarecimentos sobre a influência do CM no controle autonômico cardíaco.

## CONCLUSÕES

Em síntese, a partir dos resultados obtidos podemos concluir que: 1) a oscilação hormonal decorrente das diferentes fases do CM podem modificar a VFC em repouso de mulheres que não utilizam CO, sendo a fase folicular caracterizada por um aumento da atividade vagal e a fase lútea por um aumento da atividade simpática cardíaca; 2) a utilização de CO com uma dosagem constante dos hormônios gonadais femininos atenuam essas alterações na VFC; e 3) as diferentes fases do CM não modificam a retirada vagal cardíaca na transição repouso-exercício independente do uso de CO.

## REFERÊNCIAS

AKSELROD, S. et al. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*, v. 213, n. 4504, p. 220-222, Jul. 1981.

ALMEIDA, M. B.; RICARDO, D. R.; ARAÚJO, C. G. Validation of the 4-second exercise test in the orthostatic position. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 83, n. 2, p. 160-164, Aug 2004.

ARAÚJO, C. G.; NÓBREGA, A. C., CASTRO, C. L. Vagal activity: effect of age, sex and physical activity pattern. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 22, n. 7, p. 909-911, 1989.

ARAÚJO, C. G.; NÓBREGA, A. C.; CASTRO, C. L. Heart rate responses to deep breathing and 4-seconds of exercise before and after pharmacological blockade with atropine and propranolol. *Clin. Auton. Res.*, v. 2, n. 1, p. 35-40, Feb 1992.

ARAÚJO, C. G.; RICARDO, D. R.; ALMEIDA, M. B. Intra and interdays reliability of the 4-second exercise test. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 9, n. 5, p. 299-303, Set/Out. 2003.

BAI, X. et al. Influence of the menstrual cycle on nonlinear properties of heart rate variability in young women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 297, n. 2, p. H765-H774. Aug 2009.

BAKER, F. C.; COLRAIN, I. M.; TRINDER, J. Reduced parasympathetic activity during sleep in the symptomatic phase of severe premenstrual syndrome. *J. Psychosom. Res.*, v. 65, n. 1, p. 13-22, 2008.

BELLER, J. P.; MCCARTNEY, C. R. Cardiovascular risk and combined oral contraceptives: clinical decisions in settings of uncertainty. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 208, n. 1, p. 39-41, Jan 2013.

BIGGER, J. T. Jr. et al. Components of heart rate variability measured during healing of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, v. 61, n. 4, p. 208-215, Feb 1988.

BIGGER, J. T. Jr. et al. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*, v. 85, n. 1, p. 164-171, Jan 1992.

BOYETT, M. R. 'And the beat goes on'. The cardiac conduction system: the wiring system of the heart. *Exp. Physiol.*, v. 94, n. 10, p. 1035-1049, Oct 2009.

CACIOPPO, J. T. et al. Autonomic cardiac control. II. Noninvasive indices and basal response as revealed by autonomic blockades. *Psychophysiology*, v. 31, n. 6, p. 586-598, Nov 1994.

CANKAR, K.; FINDERLE, Z. Gender differences in cutaneous vascular and autonomic nervous response to local cooling. *Clin. Auton. Res.*, v. 13, n. 3, p. 214-220, Jun 2003.

CIPRYAN, L.; LITSCHMANNOVA, M. Intra-day and inter-day reliability of heart rate variability measurement. *J. Sports Sci.*, v. 31, n. 2, p.150-158, 2013.

EWING, D. J. Heart rate variability: an important new risk factor in patients following myocardial infarction. *Clin. Cardiol.*, v. 14, n. 8, p. 683-685, Aug 1991.

FORTES, L. S. et al. Influência do ciclo menstrual na força muscular e percepção subjetiva do esforço em atletas de natação que utilizam contraceptivos. *Rev Bras Ci Mov.*, 2015 [in press].

FAGRAEUS, L.; LINNARSSON, D. Autonomic origin of heart rate fluctuations at the onset of muscular exercise. *J. Appl. Physiol.*, v.40, n. 5, p. 679-682, May 1976.

FREYSCHUSS, U. Cardiovascular adjustment to somatomotor activation. The elicitation of increments in heart rate, aortic pressure and venomotor tone with the initiation of muscle contraction. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, v. 342, p. 1-63, 1970.

GALINIER, M. et al. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *Eur. Heart J.*, v. 21, n. 6, p. 475-482, Mar 2000.

GRADY-WELIKY, T. A. Clinical practice. Premenstrual dysphoric disorder. *N. Engl. J. Med.*, v.348, n. 5, p. 433-438, 2003.

HIRSHOREN, N. et al. Menstrual cycle effects on the neurohumoral and autonomic nervous systems regulating the cardiovascular system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 87, n. 4, p. 1569-1575, Apr 2002.

HOLLANDER, A. P.; BOUMAN, L. N. Cardiac acceleration in man elicited by a muscle heart reflex. *J. Appl. Physiol.*, v. 38, n. 2, p. 272-278, Feb 1975.

KLEIGER, R. E. et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.*, v. 59, n. 4, p. 256-262, Feb 1987.

KLEIGER, R. E. et al. Time domain measurements of heart rate variability. *Cardiol. Clin.*, v. 10, n. 3, p. 487-498 Aug 1992.

KNOPFLI, B. H.; BAR-OR, O. Vagal activity and airway response to ipratropium bromide before and after exercise in ambient and cold conditions in healthy cross-country runners. *Clin. J. Sport Med.*, v. 9, n. 3, p. 170-176, Jul 1999.

KOOPMAN, J. J. et al. Heart rate variability, but not heart rate, is associated with handgrip strength and mortality in older Africans at very low cardiovascular risk: A population-based study. *Int. J. Cardiol.*, v. 187, p. 559-561, May 2015.

LA ROVERE, M. T. et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*, v. 351, n. 9101, p. 478-484, Feb 1998.

LEICHT, A. S.; HIRNING, D. A.; ALLEN, G. D. Heart rate variability and endogenous sex hormones during the menstrual cycle in young women. *Exp. Physiol.*, v. 88, n. 3, p. 441-446, May 2003.

LINDQVIST, A. Noninvasive methods to study autonomic nervous control of circulation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, v. 588, p. 1-107, 1990.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, v. 84, n. 2, p. 482-492, 1991.

MATSUMOTO, T. et al. Altered autonomic nervous system activity as a potential etiological factor of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. *Biopsychosoc. Med.*, v. 20, n. 24, p. 1-8, 2007.

MATSUO, H. et al. Effect of menstrual cycle and gender on ventilatory and heart rate responses at the onset of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 90, n. 1-2, p. 100-108, Sep 2003.

MCKINLEY, P. S. et al. The impact of menstrual cycle phase on cardiac autonomic regulation. *Psychophysiology*, v. 46, n. 4, p. 904-911, Jul 2009.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.*, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, Jun 1999.

MIDDLEKAUFF, H. R.; PARK, J.; GORNBEIN, J. A. Lack of effect of ovarian cycle and oral contraceptives on baroreceptor and nonbaroreceptor control of sympathetic nerve activity in healthy women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 302, n. 12, p. H2560-H2566, Jun 2012.

MILLAR, P. J. et al. Isometric handgrip exercise improves acute neurocardiac regulation. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 107, n. 5, p. 509-515, Nov 2009.

NÓBREGA, A. C; ARAÚJO, C. G. Heart rate transient at the onset of active and passive dynamic exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 25, n. 1, p. 37-41, Jan 1993.

OLIVEIRA, R. B. et al. Influence of different respiratory maneuvers on exercise-induced cardiac vagal inhibition. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 97, n. 5, p. 607-612, Jul 2006.

POMERANZ, B. et al. Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *Am. J. Physiol.*, v. 248, n. 1 Pt 2, p. H151-H153, Jan 1985.

RICARDO, D. R. et al. Initial and final exercise heart rate transients: influence of gender, aerobic fitness, and clinical status. *Chest*, v. 127, n. 1, p. 318-327, Jan 2005.

RICARDO, D. R. et al. Cardiac vagal withdrawal and reactivation during repeated rest-exercise transitions. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 110, n. 5, p. 933-942, Nov 2010.

RICH, M. W. et al. Correlation of heart rate variability with clinical and angiographic variables and late mortality after coronary angiography. *Am. J. Cardiol.*, v. 62, n. 10 Pt 1, p. 714-717, Oct 1988.

SAHLOFF O. Premenstrual disorders, autonomic nervous system, and normal menstrual cycle. *Z. Geburtshilfe Gynakol.*, v. 133, n. 1, p. 107-124, 1950.

SANDERCOCK, G. R.; BROMLEY, P. D.; BRODIE, D. A. The reliability of short-term measurements of heart rate variability. *Int. J. Cardiol.*, v. 103, n. 3, p. 238-247, 2005.

SATO, N. et al. Power spectral analysis of heart rate variability in healthy young women during the normal menstrual cycle. *Psychosom. Med.*, v. 57, n. 4, p. 331-335, Jul-Aug. 1995.

SCHUELLER, P. O. et al. Effects of synthetic progestagens on autonomic tone, neurohormones and C-reactive protein levels in young healthy females in reproductive age. *Int. J. Cardiol.*, v. 111, n. 1, p. 42-48, 2006.

SILVA, B. M. et al. Similar cardiac vagal withdrawal at the onset of arm and leg dynamic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 102, n. 6, p. 695-701, Apr 2008.

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. *Circulation*, v. 93, n. 5, p. 1043-1065, Mar 1996.

TEIXEIRA, A. L. et al. Influência das diferentes fases do ciclo menstrual na flexibilidade de mulheres jovens. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v. 18, n. 6, p. 361-364, 2012a.

TEIXEIRA, A. L. et al. Efeito das diferentes fases do ciclo menstrual na composição corporal de universitárias. *RBPFX*, v. 6, n. 35, p. 428-432, 2012b.

TEIXEIRA, A. L. et al. Effects of menstrual cycle phase on resting heart rate in healthy women. *JEPonline*, v. 15, n. 4, p. 47-54, 2012c.

TEIXEIRA, A. L. et al. Association between diferente phases of menstrual cycle and body image measures of perceived size, ideal size, and body dissatisfaction. *Percept Mot Skills*, v. 117, n. 3, p. 892-902, 2013a.

TEIXEIRA, A. L.; OLIVEIRA, E. C.; DIAS, M. R. Relationship between the level of physical activity and premenstrual syndrome incidence. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 35, n. 5, p. 210-214, 2013b.

TENAN, M. S. et al. Changes in resting heart rate variability across the menstrual cycle. *Psychophysiology*, v. 51, n. 10, p. 996-1004, Oct 2014.

TSAMPOUKOS, A. et al. Effect of menstrual cycle phase on sprinting performance. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 109, n. 4, p. 659-667, Jul 2010.

TSUJI, H. et al. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham heart study. *Circulation*, v. 94, n. 11, p. 2850-2855, Dec 1996.

VALLEJO, M. et al. Age, body mass index, and menstrual cycle influence young women's heart rate variability: a multivariable analysis. *Clin. Auton. Res.*, v. 15, n. 4, p. 292-298, Aug 2005.

VIANNA, L. C. et al. Water intake accelerates post-exercise cardiac vagal reactivation in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 102, n. 3, p. 283-288, Feb 2008.

VIANNA, L. C. et al. Effect of muscle mass on muscle mechanoreflex-mediated heart rate increase at the onset of dynamic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 108, n. 3, p. 429-434, Feb 2010.

WEISSMAN, A. et al. Modulation of heart rate variability by estrogen in young women undergoing induction of ovulation. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 105, n. 3, p. 381-386, Feb 2009.

WHITE, D. W.; RAVEN, P. B. Autonomic neural control of heart rate during dynamic exercise: revisited. *J. Physiol.*, v. 592, n. Pt 12, p. 2491-2500, Jun 2014.

WICHIANPITAYA, J.; TANEEPANICHSKUL, S. A comparative efficacy of low-dose combined oral contraceptives containing desogestrel and drospirenone in premenstrual symptoms. *Obstet. Gynecol. Int.*, v. 2013, p. 487143, 2013.

XHYHERI, B. et al. Heart rate variability today. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, v. 55, n. 3, p. 321-331, Nov-Dec 2012.

XING, D. et al. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 29, n. 3, p. 289-295, Mar 2009.

YILDIRIR, A. et al. Effects of menstrual cycle on cardiac autonomic innervation as assessed by heart rate variability. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.*, v. 7, n. 1, p. 60-63, Jan 2002.

ZAMBOTTI, M. et al. Autonomic regulation across phases of the menstrual cycle and sleep stages in women with premenstrual syndrome and healthy controls. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 11, p. 2618-2627, Nov 2013.

ZUCKERMAN, S. The comparative physiology of the menstrual cycle. *Br. Med. J.*, v. 2, n. 3754, p. 1093-1097, Dec 1932.

**ANEXO A - Artigo 2 publicado.**

Teixeira AL, Ramos PS, Vianna LC, Ricardo DR. Heart rate variability across the menstrual cycle in young women taking oral contraceptives. *Psychophysiology* 2015;52:145-5. doi:10.1111/psyp.12510.



*Psychophysiology*, 52 (2015), 1451–1455. Wiley Periodicals, Inc. Printed in the USA.  
Copyright © 2015 Society for Psychophysiological Research  
DOI: 10.1111/psyp.12510

---

## Heart rate variability across the menstrual cycle in young women taking oral contraceptives

---

ANDRÉ L. TEIXEIRA,<sup>a,b</sup> PLÍNIO S. RAMOS,<sup>a</sup> LAURO C. VIANNA,<sup>c</sup> AND DJALMA R. RICARDO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Maternity Hospital Therezinha de Jesus, Faculty of Medical and Health Sciences–SUPREMA, Juiz de Fora, Brazil

<sup>b</sup>Postgraduate program, Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup>Faculty of Physical Education, University of Brasília, Brasília, Brazil

**Periódico:** Psychophysiology

**Qualis CAPES:** A1

**Fator de impacto:** 2.986

Running head: AUTONOMIC MODULATION AND ORAL CONTRACEPTIVES

Heart rate variability across the menstrual cycle in young women taking oral contraceptives

André L. Teixeira<sup>a,b</sup>

Plínio S. Ramos<sup>a</sup>

Lauro C. Vianna<sup>c</sup>

Djalma R. Ricardo<sup>a</sup>

a - Maternity Hospital Therezinha de Jesus. Faculty of Medical and Health Sciences - SUPREMA - Juiz de Fora, MG, Brazil.

b - Postgraduate program in Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

c - Faculty of Physical Education, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

**Author correspondence:**

Djalma Rabelo Ricardo, PhD

Alameda Salvaterra 200, Juiz de fora, MG, Brazil.

Zip Code: 36.033-003

Phone: +55 (32) 2010-5000

E-mail: [djalmaricardo@suprema.edu.br](mailto:djalmaricardo@suprema.edu.br)

## Abstract

Previous studies have shown that resting heart rate variability (HRV) is modified by different phases of the menstrual cycle in non-users of oral contraceptive pills (OCP); however, the effect of OCP on autonomic control of the heart remains unclear. The purpose of this study was to investigate HRV during the “low hormone” (LH – not taking OCP) and during the “high hormone” (HH – active OCP use) phases of the menstrual cycle in young women. Seventeen healthy women (19–31 years) taking OCP for at least six consecutive months were enrolled in this study. Plasma estradiol and progesterone were verified at each visit. HRV was assessed by using one-lead electrocardiography in time and frequency domains, in which participants rested in the supine position for a 20-min period with a breathing rate of 15 cycles/min. In addition, resting heart rate, systolic and diastolic blood pressure were obtained. Both plasma estradiol (LH:  $19.8 \pm 4.2$  pg/mL vs. HH:  $12.4 \pm 1.5$  pg/mL;  $p > .05$ ), and progesterone (LH:  $0.247 \pm 0.58$  ng/mL vs. HH:  $0.371 \pm 0.08$  ng/mL;  $p > .05$ ) (mean  $\pm$  standard error) levels were similar in both phases. No significant difference was obtained for any component of HRV, heart rate or blood pressure between the LH and HH phases ( $p > .05$ ). These results provide preliminary evidence that use of OCP does not affect HRV during the menstrual cycle in healthy women.

**Keywords:** estrogen, progesterone, contraceptive agents, autonomic nervous system, heart rate

The menstrual cycle (MC) is characterized by cyclical variations in female sex hormones, especially, estrogen and progesterone, which are low during the follicular phase and reach their peak during the luteal phase of the MC (Zuckerman, 1932). These cyclical variations have been associated with several physiological and psychological changes in premenopausal women. Importantly, the use of oral contraceptive pills (OCP) is a strategy

often used by women to prevent pregnancy, in which a constant exogenous dosage of female hormones attenuates these cyclical variations (Beller & McCartney, 2013).

Several studies have been performed to assess the influence of different phases of the MC on cardiac autonomic modulation in non-users of OCP. Most studies (Sato et al., 1995; Hirshoren et al., 2002; Yildirim et al., 2002; Vallejo et al., 2005; Bai et al., 2009; McKinley et al., 2009; Tenan et al., 2014), but not all (Cankar & Funderle, 2003; Leicht et al., 2003), have demonstrated that the physiological variations observed in female sex hormones occurring across the MC could modify cardiac autonomic modulation assessed by heart rate variability (HRV). These studies suggest that the follicular phase is characterized by enhanced cardiac vagal activity and the luteal phase is characterized by an increase in sympathetic activity. Unfortunately, the effect of OCP use on the neural control of the heart remains to be further explored.

The measurement of HRV (the cyclical beat-to-beat variation of the heart rate) is a noninvasive technique often used to evaluate the influence of sympathetic and parasympathetic (vagal) activity on the heart (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996), and is used as a predictor of mortality in patients with cardiac disease (Galinier et al., 2000; La Rovere et al., 1998; Tsuji et al., 1996; Bigger et al., 1992; Ewing, 1991; Rich et al., 1988; Kleiger et al., 1987), and in people with low cardiovascular risk (Koopman et al., 2015). To the best of our knowledge, no study has been conducted associating the different phases of the MC and HRV in women who are users of OCP. We hypothesized that the changes in cardiac autonomic modulation during the MC previously reported in non-OCP users (Sato et al., 1995; Hirshoren et al., 2002; Yildirim et al., 2002; Vallejo et al., 2005; Bai et al., 2009; McKinley et al., 2009; Tenan et al., 2014) would be blunted by the use of OCP. Given these

considerations, the purpose of this study was to assess the cardiac autonomic modulation by HRV during two different timings of OCP use in healthy young women.

## **Method**

### **Participants**

Seventeen apparently healthy women (mean  $\pm$  SD [min–max]) (age  $24.4 \pm 3.7$  [19–31] years; weight  $59.1 \pm 5.5$  [52.0–70.4] kg; height  $163.7 \pm 4.7$  [158.0–172.0] cm) were enrolled in this study. All participants were users of monophasic OCP, which provided 0.020 to 0.035 mg of ethinyl estrogen and low-dose progestin for 21 days and placebo for 7 days, for at least 6 consecutive months. A detailed medical history was obtained from all participants, and they underwent a standard physical examination. Subjects were confirmed to have no heart disease by using electrocardiography (ECG) tracing. As inclusion criteria, subjects had to be eumenorrheic, asymptomatic, nonsmokers, normotensive, nondiabetic, nonobese (body mass index falling in the normal weight category of 18.5–24.9 kg/m<sup>2</sup>), physically active (habitual physical activity for at least 6 consecutive months with a minimum frequency of 3 days per week in  $\geq 30$ -min sessions), and non-users of any medications that could interfere with the experimental procedures, with the exception of OCP.

All study procedures were approved by the local institutional research committee (protocol number 276.778) in accordance with the Declaration of Helsinki on ethical principles for medical research involving human subjects developed by the World Medical Association (WMA). All subjects participated in the present study voluntarily, receiving no financial incentive. Participants were informed that they could withdraw at any time. Each subject read and signed a specific informed consent form.

## **Menstrual phases**

Initially, each participant recorded the timing of her MC in a MC history questionnaire covering the previous two months. The volunteers were studied randomly twice, once during the LH phase [mean  $\pm$  SD] ( $3.6 \pm 1.5$  days after starting the placebo pill), and once during the HH phase ( $21.5 \pm 1.0$  days after the onset of menstruation, during the active OCP). We named the menstrual phases as “low” and “high” hormone phases; this refers to exogenous dosage of female sex hormones provided by OCP. Accordingly, when women were not taking OCP this was defined as the low exogenous hormone dosage period (“low hormone” phase – LH), while a high dosage of exogenous hormones (“high hormone” phase – HH) accompanied women while taking OCP.

The blood levels of estradiol and progesterone were determined during each phase of the MC. Thus, a 5-mL blood sample was collected from the antecubital vein and centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 4°C, and serum ovarian hormones were measured using an electrochemiluminescence technique (Architect Plus, I 2000, Abbot Diagnostics, USA). Women entered the study at different phases of the MC. Seven women initiated the study procedures in the LH phase and 10 women in the HH phase of their MC.

## **HRV analysis**

HRV was determined in accordance with the guidelines of the Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996). A continuous recording of a single lead ECG, usually CC<sub>5</sub> or CM<sub>5</sub>, was obtained continuously during the test. Variables were sampled at 1000 Hz and stored for offline analysis (PowerLab 4/25T and Lab Chart Pro 7 software; ADInstruments, Australia).

Only segments without noise were analyzed. All ectopic beats were identified both automatically and manually and excluded from the analysis.

The following time-domain measurements of HRV were calculated: a) standard deviation of all normal-to-normal (NN) intervals (SDNN); b) percentage of differences between adjacent normal NN intervals that were  $> 50$  ms (pNN50); and c) the square root of the mean squared differences of successive normal NN intervals (rMSSD). The power spectra were quantified by measuring the area under the following frequency bands: low-frequency power (LF) (0.04–0.15 Hz) and high-frequency (HF) power (0.15–0.4 Hz). Total power and the normalized units (nu) of LF and HF were also calculated. Normalized units were calculated by dividing each spectral band by the total power minus the very low-frequency power ( $< 0.04$  Hz) and were multiplied by 100. The ratio of LF to HF (LF/HF) was also calculated as a measure of autonomic balance.

### **Study protocol**

Subjects were evaluated during two different phases of OCP use. Subjects were asked to refrain from consuming caffeine/alcohol and from engaging in physical exercise for six and 24 h, respectively, prior to the tests. To avoid potential diurnal variations, subjects were always tested at the same time of day and in the same quiet, temperature-controlled room (24°C).

Initially, blood samples were obtained for hormonal analysis. The participants' body weight was assessed using a digital weighing scale (Welmy®, Brazil). Height was determined using a stadiometer with millimeter precision (Sanny®, Brazil). Resting heart rate was obtained by using a one-lead (CC<sub>5</sub> or CM<sub>5</sub>) ECG with a PowerLab system (ADInstruments, Australia). Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure were obtained by the

auscultatory method (BD<sup>®</sup>, Brazil). Participants were placed in the supine position in a relaxed state for 20 min with a metronome-controlled breathing rate (15 cycles/min). Measurements were determined during the final 10-min period. An initial 10-min period was utilized to ensure the attainment and stabilization of the heart rate.

### Statistical analysis

The Shapiro-Wilk normality test was used to analyze the normality of the distribution of data. All variables were compared by using paired *t* tests. We used either SPSS (version 19.0, IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA) or GraphPad Prism (version 5.010; GraphPad Software, La Jolla California USA) to perform all statistical analyses and to generate figures. The significance level adopted was  $p < .05$ .

### Results

Hemodynamic and hormone values are presented in Table 1. No significant differences were observed between the LH and HH phase considering the heart rate and blood pressure ( $p > .05$ ). Both plasma estradiol (LH:  $19.8 \pm 4.2$  pg/mL vs. HH:  $12.4 \pm 1.5$  pg/mL;  $p = .06$ ), and progesterone (LH:  $0.247 \pm 0.58$  ng/mL vs. HH:  $0.371 \pm 0.08$  ng/mL;  $p = .22$ ) (mean  $\pm$  standard error [SEM]) levels were similar in both phases.

Table 2 shows HRV indices in the time domain did not vary according to the MC phase. Figure 1 presents the values of HRV in the frequency domain during the LH and HH phases of the cycle. The LF component (LH:  $756.4 \pm 178.9$  ms<sup>2</sup> vs. HH:  $834.0 \pm 211.0$  ms<sup>2</sup>,  $p = .27$ , mean  $\pm$  SEM) and HF component (LH:  $2522.6 \pm 510.6$  ms<sup>2</sup> vs. HH:  $1926.1 \pm 282.3$

$\text{ms}^2$ ,  $p = .09$ , mean  $\pm$  SEM) were not different during the course of the MC. Similarly, there were no differences between LH and HH phases in LF (nu) (LH:  $24.8 \pm 3.4$  vs. HH:  $27.0 \pm 3.7$ ;  $p = .26$ , mean  $\pm$  SEM), and HF (nu) (LH:  $69.9 \pm 3.5$  vs. HH:  $69.1 \pm 3.6$ ;  $P = 0.40$ , mean  $\pm$  SEM). The LF/HF ratio is shown in Figure 2. No significant difference was found between the LH and HH phases ( $0.431 \pm 0.11$  vs.  $0.468 \pm 0.09$ , respectively,  $p = .37$ , mean  $\pm$  SEM).

## Discussion

The MC is characterized by a rhythmic variation in the secretion of female sex hormones, and it corresponds to changes in sexual organs and other physiological responses; however, the use of monophasic OCP provides a constant dosage of female hormones that attenuates these cyclical variations. This study was performed to assess the influence of the MC on cardiac autonomic modulation by HRV in women who are taking OCP. The findings are consistent with our initial hypothesis that the different phases of OCP do not modify the heart rate, blood pressure or indices of HRV in both time and frequency domains. The maintenance of constant estrogen and progesterone levels across the MC seem to be responsible for the results of the present study in which no changes in HRV were observed between LH and HH phase. On the other hand, the rMSSD had a tendency to increase in the LH phase compared to the HH phase of the MC ( $p = .08$ ), which may be clinically relevant.

There are two types of HRV measures: variables in the time domain and variables in frequency domain. In the time domain, the rMSSD mainly reflects cardiac vagal activity (Bigger et al., 1988; Kleiger et al., 1992). The SDNN reflects the total variability and is assumed to be the strongest predictor in cardiac diseases (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996). The variables in the frequency domain are derived from the spectral analysis of power long-term or short-term records and are used to distinguish the predominance of sympathetic or

parasympathetic branches (Akselrod et al., 1981). The HF band is the respiratory sinus arrhythmia and mainly reflects vagal function (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996). The LF band is influenced by baroreceptors regulating blood pressure and mainly reflects the activity of the sympathetic branch (Akselrod et al., 1981; Pomeranz et al., 1985; Lindqvist, 1990). Although controversial (Malliani et al., 1991; Cacioppo et al., 1994), the LF/HF ratio (an index of the interaction between sympathetic and vagal activity) has been used to assess the fractional distribution between the two systems and is an important marker of sympathovagal balance (Xhyheri et al., 2012).

Previous studies have evaluated the HRV during the course of the MC in non-OCP users and demonstrated that the different phases of the MC can modify the cardiac autonomic modulation (Sato et al., 1995; Hirshoren et al., 2002; Yildirim et al., 2002; Vallejo et al., 2005; Bai et al., 2009; McKinley et al., 2009; Tenan et al., 2014). For example, Sato et al. (1995) observed, through a power spectral analysis of HRV, that sympathetic nervous system activities were predominant in the luteal phase compared with the follicular phase of the MC. McKinley et al. (2009) found that resting heart rate was lower and HRV was higher during the follicular phase than the luteal phase of the MC. In addition, Bai et al. (2009) demonstrated through an assessment of HRV that the HF components decreased from the follicular phase to the luteal phase, while the LF components and the LF/HF ratio increased. Recently, Tenan et al. (2014) evaluated 13 non-OCP users during five different moments of the MC and showed that heart rate increased and HRV decreased after ovulation (~14 days after bleeding). According to these authors, the follicular phase is characterized by enhanced vagal activity and the luteal phase is characterized by enhanced sympathetic activity.

In contrast to the aforementioned results, other authors have found no significant differences in the autonomic control of heart rate throughout the MC. For example, Leicht et

al. (2003) and Cankar & Finderle (2003) showed that the normal cyclic variations in endogenous female hormone levels that occurred during the MC in non-OCP users were not significantly associated with changes in cardiac autonomic control as measured by HRV. In relation to the use of OCP, Teixeira et al. (2012) compared non-OCP users and OCP users throughout the MC and found no significant differences between groups or within groups in resting heart rate during three different phases of the MC (follicular, ovulatory and luteal). Additionally, Middlekauf et al. (2012) compared baroreceptor and non-baroreceptor control during the follicular and luteal phases of the MC in non-OCP and OCP users. The authors used various protocols, including microneurography, baroreflex activation and deactivation, and the cold pressor test, and the results showed a significant difference only in sympathetic nerve activity, which was lower during the follicular (LH) compared with the luteal (HH) phase in non-OCP users, but was not different between phases in OCP users. No significant differences were obtained for all other variables. Recently, our group evaluated the cardiac autonomic modulation during the rest-to-exercise transition in non-OCP users and OCP users and found that cardiac vagal withdrawal at the onset of exercise was not affected by the MC, independent of the use of OCP (Teixeira et al. 2015). These studies are in agreement with our observation that no differences were obtained in the resting heart rate, blood pressure, or HRV between LH and HH phases during the MC in OCP users.

Previous studies have shown the protective effects of estrogen on the cardiovascular system (Xing et al., 2009; Mendelson & Karas, 1999). Estrogen has both rapid vasodilatory effects, including enhanced nitric oxide synthesis, and longer-term actions that inhibit the response to vascular injury and prevent atherosclerosis (Mendelson & Karas, 1999). Weissman et al. (2009) demonstrated that the acute increase in estrogen level during the ovulation induction protocol is associated with vagal activation in young women. The cyclical variations in hormone levels that are observed during the different phases of the MC in

women who are non-OCP users may alter cardiac autonomic modulation, but the use of OCP having a constant dosage of female sex hormones attenuated these cyclical oscillations and may blunt the changes in autonomic control of heart.

It is common in HRV studies performed in women that authors do not take into account the different phases of the MC. Previous studies have demonstrated that HRV can be modified during different phases of the MC in non-OCP users, but our results show that these changes are blunted by the administration of OCP. The present study adds to the body of knowledge on the behavior of cardiac autonomic modulation by HRV across the MC, and the MC and/or use of OCP must be taken into consideration in studies examining HRV.

### **Limitations and future directions**

The limitations of this study should be considered such as the size of the study sample and the potential for type II error is acknowledged. Using a very conservative approach, one of the major limitations is that our study may be underpowered. However, the time-intensive nature of well-controlled studies across the MC commonly results in a low sample size (Tenan et al., 2014; Middlekauf et al., 2012; Bai et al., 2009; Hirshoren et al., 2002; Leicht et al., 2003; Sato et al., 1995). For most research purposes, blood pressure should be recorded using validated digital measurement devices avoiding any potential observer bias in the readings that may occur with the auscultatory method. In addition, the results of the present study cannot be extrapolated for other populations such sedentary, amenorrheic, or diseased women. Future research should be conducted in these populations for more information and better clarification about the relationship between OCP use and cardiac autonomic modulation.

### **Conclusions**

In summary, the results of this study provide preliminary evidence that HRV is not affected by the administration of OCP during the MC in healthy young women. These findings may be important for a better understanding of cardiac autonomic modulation across the MC in users of OCP, and for providing insight into whether the subjects MC and/or OCP use should be considered to have an effect in studies examining HRV.

## References

- Akselrod, S., Gordon, D., Ubel, F. A., Shannon, D. C., Berger, A. C., & Cohen, R. J. (1981). Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*, 213, 220-222. doi:10.1126/science.6166045
- Bai, X., Li, J., Zhou, L., & Li, X. (2009). Influence of the menstrual cycle on nonlinear properties of heart rate variability in young women. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 297, H765-H774. doi:10.1152/ajpheart.01283.2008
- Beller, J. P., & McCartney, C. R. (2013). Cardiovascular risk and combined oral contraceptives: clinical decisions in settings of uncertainty. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 208, 39-41. doi:10.1016/j.ajog.2012.01.037
- Bigger, J. T. Jr., Kleiger, R. E., Fleiss, J. L., Rolnitzky, L. M., Steinman, R. C., & Miller, J. P. (1988). Components of heart rate variability measured during healing of acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 61, 208-215. doi:10.1016/0002-9149(88)90917-4
- Bigger, J. T. Jr., Fleiss, J. L., Steinman, R. C., Rolnitzky, L. M., Kleiger, R. E., & Rottman, J. N. (1992). Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*, 85, 164-171. doi:10.1161/01.CIR.85.1.164
- Cacioppo, J. T., Berntson, G. G., Binkley, P. F., Quigley, K. S., Uchino, B. N., & Fieldstone, A. (1994). Autonomic cardiac control. II. Noninvasive indices and basal response as revealed by autonomic blockades. *Psychophysiology*, 31, 586-598. doi:10.1111/j.1469-8986.1994.tb02351.x
- Cankar, K., & Finderle, Z. (2003). Gender differences in cutaneous vascular and autonomic nervous response to local cooling. *Clinical Autonomic Research*, 13, 214-220. doi:10.1007/s10286-003-0095-5

- Ewing, D. J. (1991). Heart rate variability: an important new risk factor in patients following myocardial infarction. *Clinical Cardiology*, 14, 683-685. doi:10.1002/clc.4960140811
- Galinier, M., Pathak, A., Fourcade, J., Androdias, C., Curnier, D., Varnous, S., ...Bounhoure, J. P. (2000). Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *European Heart Journal*, 21, 475-482. doi:10.1053/euhj.1999.1875
- Hirshoren, N., Tzoran, I., Makrienko, I., Edoute, Y., Plawner, M. M., Itskovitz-Eldor, J., & Jacob, G. (2002). Menstrual cycle effects on the neurohumoral and autonomic nervous systems regulating the cardiovascular system. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87, 1569-1575. doi:10.1210/jcem.87.4.8406
- Kleiger, R. E., Miller, J. P., Bigger, J. T. Jr., & Moss, A. J. (1987). Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 59, 256-262. doi:10.1016/0002-9149(87)90795-8
- Kleiger, R. E., Stein, P. K., Bosner, M. S., & Rottman, J. N. (1992). Time domain measurements of heart rate variability. *Cardiology Clinics*, 10, 487-498.
- Koopman, J. J., van Bodegom, D., Maan, A. C., Li, Z., Ziem, J. B., Westendorp, R. G., & Jukema, J. W. (2015). Heart rate variability, but not heart rate, is associated with handgrip strength and mortality in older Africans at very low cardiovascular risk: A population-based study. *International Journal of Cardiology*, 187, 559-561. doi:10.1016/j.ijcard.2015.03.383
- La Rovere, M. T., Bigger, J. T. Jr., Marcus, F. I., Mortara, A., & Schwartz, P. J. (1998). Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*, 351, 478-484. doi:10.1016/S0140-6736(97)11144-8

- Leicht, A. S., Hirning, D. A., & Allen, G. D. (2003). Heart rate variability and endogenous sex hormones during the menstrual cycle in young women. *Experimental Physiology*, 88, 441-446. doi:10.1113/eph8802535
- Lindqvist, A. (1990). Noninvasive methods to study autonomic nervous control of circulation. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 588, 1-107.
- Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F., & Cerutti, S. (1991). Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*, 84, 482-492.  
doi:10.1161/01.CIR.84.2.482
- McKinley, P. S., King, A. R., Shapiro, P. A., Slavov, I., Fang, Y., Chen, I. S., ...Sloan, R. P. (2009). The impact of menstrual cycle phase on cardiac autonomic regulation. *Psychophysiology*, 46, 904-911. doi:10.1111/j.1469-8986.2009.00811.x
- Mendelsohn, M. E., & Karas, R. H. (1999). The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*, 340, 1801-1811.  
doi:10.1056/NEJM199906103402306
- Middlekauff, H. R., Park, J., & Gornbein, J. A. (2012). Lack of effect of ovarian cycle and oral contraceptives on baroreceptor and nonbaroreceptor control of sympathetic nerve activity in healthy women. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 302, H2560-H2566. doi:10.1152/ajpheart.00579.2011
- Pomeranz, B., Macaulay, R. J., Caudill, M. A., Kutz, I., Adam, D., Gordon, D., ...Benson, H. (1985). Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *American Journal of Physiology*, 248, H151-H153.
- Rich, M. W., Saini, J. S., Kleiger, R. E., Carney, R. M., teVelde, A., & Freedland, K. E. (1988). Correlation of heart rate variability with clinical and angiographic variables and

late mortality after coronary angiography. *American Journal of Cardiology*, 62, 714-717. doi:10.1016/0002-9149(88)91208-8

Sato, N., Miyake, S., Akatsu, J., & Kumashiro, M. (1995). Power spectral analysis of heart rate variability in healthy young women during the normal menstrual cycle. *Psychosomatic Medicine*, 57, 331-335.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. (1996). Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*, 93, 1043-1065.  
doi:10.1161/01.CIR.93.5.1043

Teixeira, A. L., Fernandes, W. Jr., Moraes, E. M., Alves, H. B., Damasceno, V. O., & Dias, M. R. (2012). Effects of menstrual cycle phase on resting heart rate in healthy women. *Journal of Exercise Physiology online*, 15, 47-54.

Teixeira, A. L., Ramos, P. S., Vianna, L. C., & Ricardo, D. R. (2015) Effects of ovarian hormones and oral contraceptive pills on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise. *Plos one*, 10, e0119626. doi:10.1371/journal.pone.0119626

Tenan, M. S., Brothers, R. M., Tweedell, A. J., Hackney, A. C., & Griffin, L. (2014). Changes in resting heart rate variability across the menstrual cycle. *Psychophysiology*, 51, 996-1004. doi:10.1111/psyp.12250

Tsuji, H., Larson, M. G., Venditti, F. J. Jr., Manders, E. S., Evans, J. C., Feldman, C. L., & Levy, D. (1996). Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham heart study. *Circulation*, 94, 2850-2855. doi:10.1161/01.CIR.94.11.2850

Vallejo, M., Márquez, M. F., Borja-Aburto, V. H., Cárdenas, M., & Hermosillo, A. G. (2005). Age, body mass index, and menstrual cycle influence young women's heart rate

variability: a multivariable analysis. *Clinical Autonomic Research*, 15, 292-298.

doi:10.1007/s10286-005-0272-9

Weissman, A., Lowenstein, L., Tal, J., Ohel, G., Calderon, I., & Lightman, A. (2009).

Modulation of heart rate variability by estrogen in young women undergoing induction of ovulation. *European Journal of Applied Physiology*, 105, 381-386.

doi:10.1007/s00421-008-0914-4

Xhyheri, B., Manfrini, O., Mazzolini, M., Pizzi, C., & Bugiardini, R. (2012). Heart rate variability today. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 55, 321-331.

doi:10.1016/j.pcad.2012.09.001

Xing, D., Nozell, S., Chen, Y. F., Hage, F., & Oparil, S. (2009). Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29, 289-295.

doi:10.1161/ATVBAHA.108.182279

Yildirim, A., Kabakci, G., Akgul, E., Tokgozoglu, L., & Oto, A. (2002). Effects of menstrual cycle on cardiac autonomic innervation as assessed by heart rate variability. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, 7, 60-63. doi:10.1111/j.1542-474X.2001.tb00140.x

Zuckerman, S. (1932). The comparative physiology of the menstrual cycle. *British Medical Journal*, 17, 1093-1097.

Table 1

*Hemodynamic and hormone values for each menstrual phase.*

|                      | LH phase    | HH phase    | <i>P</i> |
|----------------------|-------------|-------------|----------|
| HR rest (bpm)        | 70.7 ± 2.8  | 71.8 ± 2.4  | .28      |
| SBP (mm Hg)          | 111.1 ± 2.4 | 108.0 ± 3.0 | .13      |
| DBP (mm Hg)          | 71.3 ± 1.6  | 68.6 ± 1.6  | .08      |
| MAP (mm Hg)          | 84.5 ± 1.7  | 81.7 ± 1.9  | .08      |
| Estradiol (pg/mL)    | 22.8 ± 4.2  | 12.4 ± 1.5  | .06      |
| Progesterone (ng/mL) | 0.829 ± 0.6 | 0.371 ± 0.1 | .22      |

*Note.* Values presented as mean ± SEM. LH: low hormone. HH: high hormone. HR: heart rate. SBP: systolic blood pressure. DBP: diastolic blood pressure. MAP: mean blood pressure. *p*: level of significance ( $p < .05$ ).

Table 2

*Heart rate variability in time domain across the menstrual cycle.*

|                       | LH phase       | HH phase       | <i>P</i> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------|
| Mean NN (ms)          | 871.8 ± 37.1   | 850.4 ± 27.9   | .18      |
| SDNN (ms)             | 68.6 ± 6.0     | 65.4 ± 4.6     | .22      |
| TP (ms <sup>2</sup> ) | 4945.5 ± 890.8 | 4631.6 ± 737.2 | .30      |
| pNN50 (ms)            | 259.8 ± 32.6   | 253.5 ± 28.0   | .42      |
| rMSSD (ms)            | 67.8 ± 8.6     | 57.9 ± 4.9     | .08      |

*Note.* Values presents as mean ± SEM. LH: low hormone. HH: high hormone. NN: normal-to-normal interval. SDNN: standard deviation of all normal-to-normal (NN) intervals. TP: total power. pNN50: percentage of differences between adjacent normal NN intervals > 50 ms. rMSSD: the square root of the mean squared differences of successive normal NN intervals. *p*: level of significance ( $p < .05$ ).

## Figures

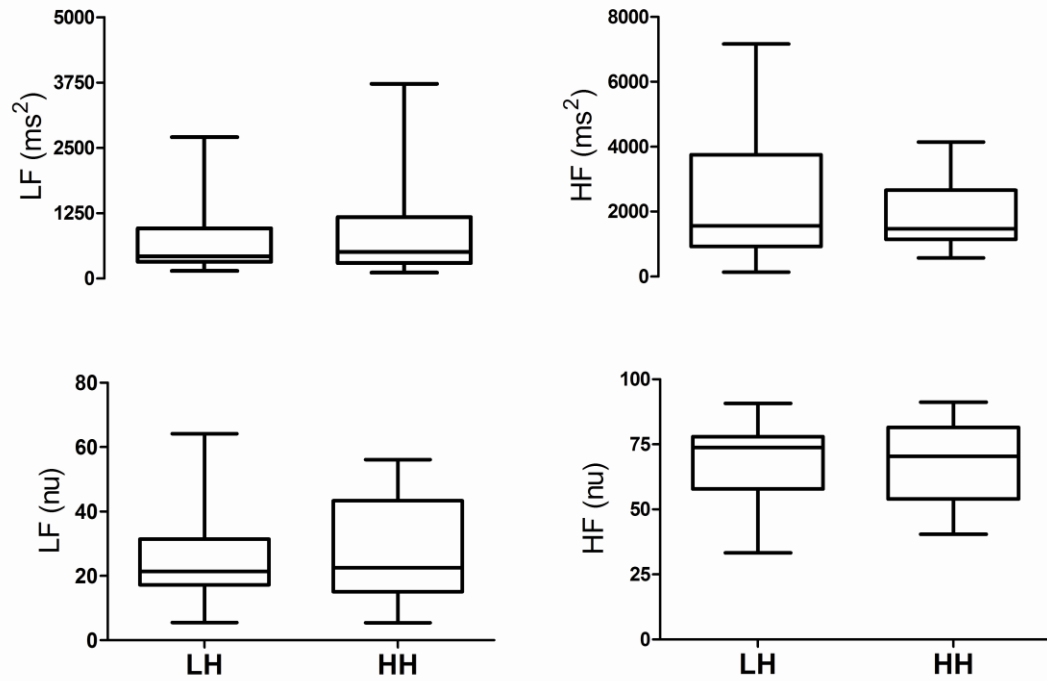


Figure 1. Heart rate variability indices in frequency domain during the low hormone (LH) and high hormone (HH) phases.

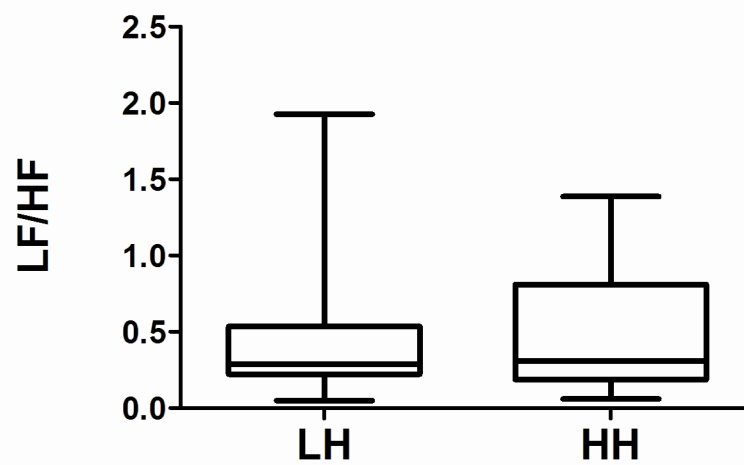


Figure 2. Low frequency and high frequency ratio (LF/HF) during the low hormone (LH) and high hormone (HH) phases.

**Anexo B:** Artigo 3 publicado.

Teixeira AL, Ramos PS, Vianna LC, Ricardo DR. Effects of ovarian hormones and oral contraceptive pills on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise. *PLoS One* 2015;10,e0119626. doi:10.1371/journal.pone.0119626



RESEARCH ARTICLE

## Effects of Ovarian Hormones and Oral Contraceptive Pills on Cardiac Vagal Withdrawal at the Onset of Dynamic Exercise

André L. Teixeira<sup>1,2</sup>, Plínio S. Ramos<sup>1,2</sup>, Lauro C. Vianna<sup>3</sup>, Djalma R. Ricardo<sup>1,2\*</sup>

**1** Maternity Hospital Therezinha de Jesus, Faculty of Medical and Health Sciences—SUPREMA, Juiz de Fora, MG, Brazil, **2** Postgraduate Program in Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **3** Faculty of Physical Education, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

\* [djalmaricardo@suprema.edu.br](mailto:djalmaricardo@suprema.edu.br)



**Periódico:** PLoS One

**Qualis CAPES:** A1

**Fator de impacto:** 3.234

## **Effects of Ovarian Hormones and Oral Contraceptive Pills on Cardiac Vagal Withdrawal at the Onset of Dynamic Exercise**

André L. Teixeira<sup>1,2</sup>, Plinio S. Ramos<sup>1,2</sup>, Lauro C. Vianna<sup>3</sup>, Djalma R. Ricardo<sup>1,2\*</sup>

1 Maternity Hospital Therezinha de Jesus, Faculty of Medical and Health Sciences -  
SUPREMA, Juiz de Fora, MG, Brazil,

2 Postgraduate Program in Exercise and Sports Sciences, State University of Rio de Janeiro  
(UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

3 Faculty of Physical Education, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

\* [djalmaricardo@suprema.edu.br](mailto:djalmaricardo@suprema.edu.br)

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of the ovarian hormones and the use of oral contraceptive pills (OCP) on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise. Thirty physically active women aged 19-32 years were divided into two groups: OCP users ( $n = 17$ ) and non-OCP users ( $n = 13$ ). Participants were studied randomly at three different phases of the menstrual cycle: early follicular (day  $3.6 \pm 1.2$ ; range 1-5), ovulatory (day  $14.3 \pm 0.8$ ; range 13-16) and midluteal (day  $21.3 \pm 0.8$ ; range 20-24), according to endogenous (in non-OCP users) or exogenous (in OCP users) estradiol and progesterone variations. The cardiac vagal withdrawal was represented by the cardiac vagal index (CVI), which was obtained by the 4-s exercise test. Additionally, resting heart rate, systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were obtained. The CVI was not significantly different between the three phases of the menstrual cycle in either the non-OCP users (early follicular:  $1.58 \pm 0.1$ ; ovulatory:  $1.56 \pm 0.1$ ; midluteal:  $1.58 \pm 0.1$ ,  $P > 0.05$ ) or OCP users (early follicular:  $1.47 \pm 0.1$ ; ovulatory:  $1.49 \pm 0.1$ ; midluteal:  $1.47 \pm 0.1$ ,  $P > 0.05$ ) (mean  $\pm$  SEM). Resting cardiovascular responses were not affected by hormonal phase or OCP use, except that the SBP was higher in the OCP users than non-OCP users in all phases of the cycle ( $P < 0.05$ ). In summary, our results demonstrate that cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise was not impacted by the menstrual cycle or OCP use in physically active women.

## Introduction

Women who experience early menopause are at increased risk of cardiovascular disease, including coronary artery disease and hypertension, compared with age-matched premenopausal women [1,2]. This low incidence of cardiovascular disease in premenopausal women has been attributed to the protective effects of endogenous female hormones, specifically estrogen [3,4]. In premenopausal women, the ovarian hormones fluctuate monthly with the menstrual cycle (MC); specifically, the early follicular phase is characterized by low levels of estradiol and progesterone, ovulatory phase occurs at the peak of estrogen, and the midluteal phase is characterized by high concentration of progesterone and, to a lesser extent, estrogen [5]. In addition, the use of oral contraceptive pills (OCP) is a strategy often used by women to prevent pregnancy, in which a constant dosage of female hormones attenuates these cyclical variations [6]. Importantly, the impact of ovarian hormones fluctuation as well as the OCP on the neural control of the heart remains to be further explored.

Several studies have examined the impact of fluctuations in female sex hormones across the MC on the autonomic control of the heart at rest. However, it remains unclear as to how the autonomic nervous system is impacted by the ovarian hormones fluctuations with equivocal results being reported. For example, Tanaka et al. [7] showed that the baroreflex-mediated control of heart rate (HR) is altered during different phases of the MC. Bai et al. [8] showed, through nonlinear properties of HR variability, that vagal activity predominates in the early follicular phase and that sympathetic activity is higher in the midluteal phase of the cycle. However, Leicht et al. [9] reported that the normal cyclic variations in hormone levels during the MC were not associated with changes in cardiac autonomic control, as assessed by HR variability. In addition, Teixeira et al. [5] found that different phases of the MC did not modify the resting HR in healthy women independent of the use of OCP. The reason for these contradictory findings is not clear but additional work is needed to further our understanding

on the impact of ovarian hormones fluctuation on autonomic control of the heart, specifically under conditions where the heart is challenged, such as dynamic exercise.

During the transition from rest-to-exercise, the rapid HR increase is predominantly mediated by vagal withdrawal, and afterward, with an increase in exercise intensity, the HR accelerates via an increase in sympathetic activity [10,11]. Matsuo et al. [12] demonstrated that HR responses at the onset of voluntary exercise and passive movement were not altered by the MC in seven healthy women, as measured by  $\Delta$ HR during the 20-s of exercise. Although this suggests lack of MC effect on the neural control of HR, a potential caveat is that this study has used only the follicular and luteal phases of the MC and ignored the ovulatory phase where there are higher levels of estradiol and low levels of progesterone. Furthermore, these authors did not aim to isolate the vagally-mediated HR response, since HR is also modulated by sympathetic activity in exercise of this duration [13,14]. To assess the relative contribution of vagal activity during the rest-to-exercise transition, Araújo et al. [15] proposed a 4-s exercise test (4sET) protocol, in which predominantly vagal activity at rest is suddenly withdrawn by fast, unloaded cycling exercise. The cardiac vagal withdrawal was represented by the cardiac vagal index (CVI) measured through the ratio between the longest and shortest RR interval during the onset of exercise. Although the 4sET is pharmacologically validated [16] and has high intra and interday reliability [17], the influence of the MC and OCP in this context needs to be further studied.

Given these considerations, we hypothesized that the cardiac vagal withdrawal would vary with the endogenous female hormones throughout the MC and that these cyclical changes in autonomic control would be blunted by the administration of OCP. Therefore, the purpose of this study was to assess the effects of endogenous variations in ovarian hormones in non-OCP users, and the administration of OCP across the MC in OCP users on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise in healthy young women.

## **Materials and Methods**

### **Ethics statement**

All study procedures were approved by the local institutional research committee (protocol number 276.778) in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association Ethics Code. All subjects participated in the present study voluntarily, receiving no financial incentive. Participants were informed that they could withdraw at any time. Each subject read and signed a specific informed consent form.

All data are only available upon request to the senior author (legal guardian of the data). This option follows the local laws and ethical regulations that apply to confidentiality of clinical/medical data.

### **Subjects**

A total of 30 healthy women aged 19-32 years (mean  $\pm$  SEM:  $24.7 \pm 0.65$  years) were enrolled in this study. Participants were divided into two groups: non-OCP users ( $n = 13$ ) and OCP users ( $n = 17$ ). A detailed medical history was obtained from all participants, and they underwent a standard physiological examination. They were confirmed to have no heart disease. As inclusion criteria, subjects had to be eumenorrheic, asymptomatic, nonsmokers, normotensive, nondiabetic, nonobese (body mass index - BMI - falling in the normal weight category of  $18.5$ - $24.9$   $\text{kg/m}^2$ ), physically active (habitual physical activity for at least 6 consecutive months with a minimum frequency of 3 days per week in  $\geq 30$ -min sessions), and non-users of any medications that could interfere with the experimental procedures. Participants also reported no intention to become pregnant within the next two months.

## Measurements

### Menstrual phases

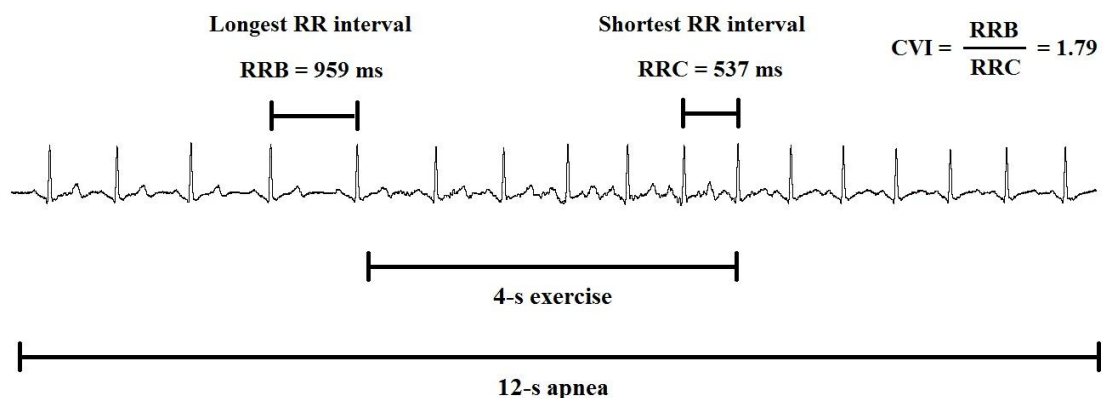
Initially, each participant recorded the timing of their MC in a MC history questionnaire covering the previous two months. Participants were evaluated during three different phases of the MC: early follicular (day  $3.6 \pm 1.2$ ; range 1-5), ovulatory (day  $14.3 \pm 0.8$ ; range 13-16) and midluteal (day  $21.3 \pm 0.8$ ; range 20-24). The timing of the menstrual phases was confirmed by analysis of the blood levels of estradiol and progesterone. For this assessment, a 5-ml blood sample was collected from the antecubital vein and centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 4°C, and serum ovarian hormones were measured by an electrochemiluminescence technique (Architect Plus, I 2000, Abbot Diagnostics, USA). Women entered the study at different phases of the MC. 12 women (6 non-OCP users) initiated the study procedures in the early follicular phase; 10 women (4 non-OCP users) in the ovulatory phase; and 8 women (3 non-OCP users) in the midluteal phase of the MC.

### Cardiac vagal withdrawal

For assessment of cardiac vagal withdrawal, we used the 4sET. Originally proposed by Araújo et al. [15], the 4sET is pharmacologically validated [16] and has high within-day and between-day reliability [17] for the isolated assessment of the integrity of cardiac vagal activity through the analysis of HR at the onset of dynamic exercise. This test is based on the concept that the latency of the sympathetic branch is longer than parasympathetic branch; therefore, at the onset of dynamic exercise, there is an almost instantaneous vagal withdrawal via a neurogenic reflex that is followed by sympathetic stimulation [18]. Previous studies have described the 4sET in detail [18-27]. Briefly, the 4sET consists of unloaded pedaling as fast as possible on a cycle ergometer (Imbramed, CG - 04, Brazil) from the fourth to the

eighth seconds of a 12-s maximal-inspiratory apnea. The subject remains seated on the cycle ergometer, and after the HR stabilizes, the verbal commands of four evaluators guide the participant's actions to be sequentially performed at 4-s intervals, as follows: 1) a fast maximal inspiration, primarily through the mouth, 2) pedaling as fast as possible, 3) sudden cessation of pedaling, and 4) expiration. A continuous recording of a single electrocardiogram (ECG) lead, usually CC<sub>5</sub> or CM<sub>5</sub>, was obtained continuously during the test. All cardiovascular variables were sampled at 1,000 Hz and stored for offline analysis (PowerLab 4/25T and Lab Chart Pro 7 software; ADInstruments, Australia).

To quantify CVI, the duration of two RR intervals was measured: the longest RR interval (*i.e.*, either the interval obtained immediately before the onset of exercise or the first interval after the onset of exercise; RRB) and the shortest RR interval during the 4sET (generally, the last RR interval; RRC). Two maneuvers were typically carried out, with a dimensionless index (the greatest ratio between the aforementioned intervals obtained during both 4sET maneuvers) being chosen to represent the CVI. Fig. 1 presents the calculation of CVI in a representative ECG tracing during the 4sET in one volunteer of the current study.



**Fig. 1. A typical ECG tracing during the 4-s exercise test in one subject of the sample. CVI: cardiac vagal index.**

## Study Protocol

Subjects were evaluated during three different phases of the MC. The subjects were asked to refrain from consuming caffeine/alcohol and from engaging in physical exercise for 6 and 24 h, respectively, prior to the tests. To avoid potential diurnal variations, subjects were always tested at the same time of day and in the same quiet, temperature-controlled room (24°C).

Initially, blood samples were obtained for hormonal analysis and confirmation of menstrual phases. The participants' body weight was assessed using a digital weighing scale (Welmy, Brazil). Height was determined using a stadiometer with millimeter precision (Sanny, Brazil). Then, BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Resting HR was obtained by a one-lead (CC<sub>5</sub> or CM<sub>5</sub>) ECG using a PowerLab system (PowerLab 4/25T and Lab Chart Pro 7 software; ADInstruments, Australia). Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were obtained by the auscultatory method (BD, Brazil). Participants were asked to be in the supine position in a relaxed state for 20 min. Measurements were determined during the final 10-min period. An initial 10-min period was utilized to ensure the attainment and stabilization of the HR. After resting measurements, subjects were submitted to the 4sET to assess CVI.

## Statistical analysis

The Shapiro-Wilk normality test and Levene's test of homogeneity of variance were used to analyze the normality of the distribution of data. All variables presented a normal distribution and equal variance. Significant differences between groups in descriptive data were assessed by the independent sample *t* test. A 2 x 3 (groups x menstrual phases) repeated-

measures ANOVA was used to compare the hormone levels, cardiovascular responses and CVI between groups throughout the MC. We then tested the sphericity of the data and used Bonferroni's post hoc test to detect differences when necessary. Effect size (ES) for each physiological variable was calculated using the partial Eta squared. Threshold values for ES were 0.02 (small), 0.13 (moderate), 0.26 (large) [28,29]. We used either Prism (version 5.01; GraphPad, USA) or SPSS (version 19; SPSS, USA) to perform all calculations and generate figures. The significance level adopted was  $P < 0.05$ .

## Results

The descriptive data of the subjects are presented in Table 1. No significant differences were observed between the groups in any descriptive measurement ( $P > 0.05$ ).

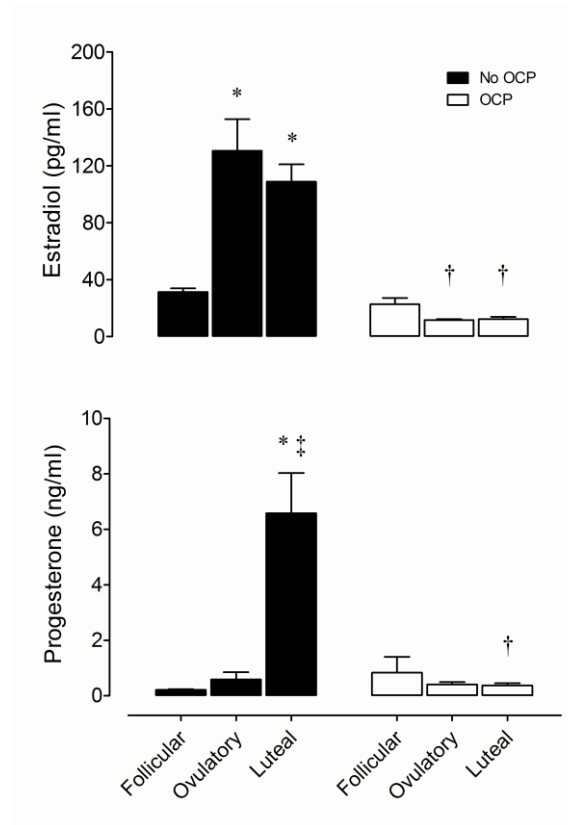
**Table 1.** Descriptive data of the subjects.

|                               | No OCP (n = 13) | OCP (n = 17) | <i>P</i> |
|-------------------------------|-----------------|--------------|----------|
| <b>Age (y)</b>                | 25.2 ± 1.0      | 24.4 ± 0.8   | 0.55     |
| <b>Weight (kg)</b>            | 57.5 ± 1.8      | 59.1 ± 1.3   | 0.46     |
| <b>Height (m)</b>             | 1.62 ± 0.02     | 1.64 ± 0.01  | 0.26     |
| <b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> | 22.0 ± 0.5      | 22.0 ± 0.3   | 0.99     |
| <b>Menarche (y)</b>           | 12.5 ± 0.3      | 12.5 ± 0.2   | 0.85     |

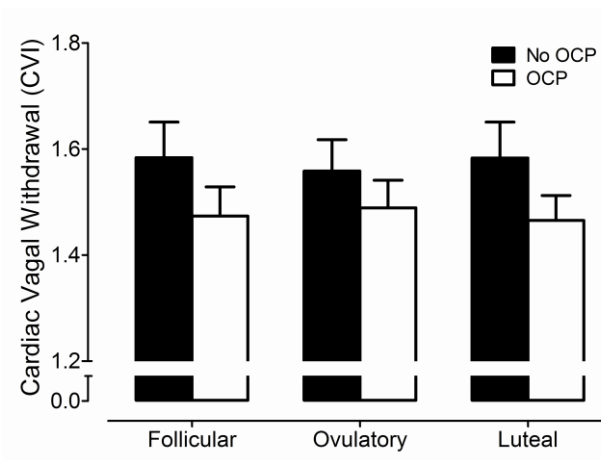
Values presents in mean ± SEM. No OCP: non-OCP users. OCP: OCP users. BMI: body mass index. *P*: level of significance ( $p < 0.05$ ).

Fig. 2 presents resting ovarian hormone concentrations across the MC. In non-OCP users, plasma estradiol concentrations were significantly higher during ovulatory (mean  $\pm$  SEM:  $130.6 \pm 22.2$  pg/ml) and midluteal (mean  $\pm$  SEM:  $108.8 \pm 12.3$  pg/ml) phases compared with early follicular phase (mean  $\pm$  SEM:  $31.3 \pm 2.6$  pg/ml) ( $P < 0.05$ ), whereas plasma progesterone level during midluteal phase (mean  $\pm$  SEM:  $6.577 \pm 1.45$  ng/ml) was significantly higher than early follicular (mean  $\pm$  SEM:  $0.215 \pm 0.02$  ng/ml) and ovulatory (mean  $\pm$  SEM:  $0.585 \pm 0.26$  ng/ml) phases of the MC. In OCP users, both plasma estradiol (early follicular:  $22.8 \pm 4.2$ ; ovulatory:  $11.6 \pm 0.7$ ; midluteal:  $12.3 \pm 1.5$  pg/ml;  $P > 0.05$ ) (mean  $\pm$  SEM), and progesterone (early follicular:  $0.829 \pm 0.58$ ; ovulatory:  $0.406 \pm 0.09$ ; midluteal:  $0.371 \pm 0.08$  ng/ml;  $P > 0.05$ ) (mean  $\pm$  SEM) concentrations were similar in all phases of MC. In addition, estradiol levels in non-OCP users was significantly higher in both ovulatory and midluteal phases, and progesterone levels was higher in midluteal phase of the cycle compared with OCP users ( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 shows that the CVI was not significantly different across the MC in either non-OCP users (early follicular:  $1.58 \pm 0.1$ ; ovulatory:  $1.56 \pm 0.1$ ; midluteal:  $1.58 \pm 0.1$ ,  $P > 0.05$ ) or OCP users (early follicular:  $1.47 \pm 0.1$ ; ovulatory:  $1.49 \pm 0.1$ ; midluteal:  $1.47 \pm 0.1$ ,  $P > 0.05$ ). In addition, there were no significant differences in CVI between groups during the three different phases of the MC ( $P > 0.05$ ; partial Eta squared: menstrual cycle = 0.002; group = 0.054; interaction = 0.028).



**Fig. 2. Levels of estradiol (above) and progesterone (below) between non-OCP users (No OCP) and OCP users (OCP) during three different phases of the cycle.** \* Significant difference ( $p < 0.001$ ) to early follicular phase. † Significant difference ( $p < 0.001$ ) between groups in same phase of the MC. ‡ Significant difference ( $p < 0.001$ ) to ovulatory phase.



**Fig. 3. Cardiac vagal withdrawal represented by cardiac vagal index (CVI) in non-OCP users (No OCP) and OCP users (OCP) across the menstrual cycle.**

The resting cardiovascular responses were presents in Table 2. HR and DBP did not vary according to MC phase or OCP use ( $P > 0.05$ ). SBP was not impacted by different phases of the MC in both non-OCP users and OCP users ( $P > 0.05$ ). However, SBP values were significantly higher in OCP users than non-OCP users in all phases of the MC ( $P = 0.004$ ).

**Table 2.** Resting cardiovascular values across the menstrual cycle in non-OCP users (No OCP) and OCP users (OCP).

|                  |            | No OCP      | OCP          | Partial Eta squared |       |             |
|------------------|------------|-------------|--------------|---------------------|-------|-------------|
|                  |            |             |              | MC                  | Group | Interaction |
| HR rest<br>(bpm) | Follicular | 66.2 ± 2.1  | 70.7 ± 2.8   |                     |       |             |
|                  | Ovulatory  | 71.8 ± 2.4  | 70.3 ± 2.0   | 0.087               | 0.008 | 0.085       |
|                  | Luteal     | 70.4 ± 2.8  | 71.8 ± 2.4   |                     |       |             |
| SBP<br>(mm/Hg)   | Follicular | 102.3 ± 2.0 | 111.1 ± 2.4* |                     |       |             |
|                  | Ovulatory  | 103.5 ± 2.2 | 108.5 ± 2.0* | 0.014               | 0.182 | 0.022       |
|                  | Luteal     | 102.2 ± 1.5 | 108.0 ± 3.0* |                     |       |             |
| DBP<br>(mm/Hg)   | Follicular | 68.0 ± 2.0  | 71.3 ± 1.6   |                     |       |             |
|                  | Ovulatory  | 67.1 ± 2.0  | 68.4 ± 1.5   | 0.063               | 0.067 | 0.011       |
|                  | Luteal     | 65.4 ± 1.7  | 68.6 ± 1.6   |                     |       |             |

Values presents in mean ± SEM. HR: heart rate, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure. MC: menstrual cycle. \* Significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups.

## Discussion

The MC is characterized by rhythmic variation in the secretion of female hormones and corresponds to changes in the sexual organs and other physiological responses. The purpose of this study was to assess the effects of the ovarian hormones and OCP on cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise. The major findings are the following: 1) CVI was not affected by endogenous ovarian hormones during the normal MC in non-OCP users, and the administration of OCP with a constant exogenous dosage of sex hormones did not change the cardiac vagal withdrawal; and 2) resting cardiovascular responses, including HR and blood pressure were not affected by the MC or OCP, with the exception of SBP which was significantly higher in OCP users compared with non-OCP users in all phases of the MC.

Although several methods are available to assess cardiac parasympathetic activity, in the present study we used the 4sET. This test is based on the concept that the latency of the sympathetic branch is longer than that of the parasympathetic branch; therefore, at the onset of dynamic exercise, an almost instantaneous vagal withdrawal occurs via a neurogenic reflex that is followed by sympathetic stimulation [18]. The 4sET has been pharmacologically validated in 15 subjects who had a complete abolition of 4-s heart rate rest-exercise transients under atropine, while large amounts of intravenous propranolol did not influence this response (the ratio between cardiac cycle interval durations measured at pre-exercise and post-fast unloaded cycling) [16]. Furthermore, Araújo et al. [17] tested the reliability of the 4sET. The interday reliability was assessed prospectively from 15 asymptomatic subjects submitted to 4sET for five consecutive days. To determine CVI intraday reliability, in one of the five days, randomly selected, nine 4sET consecutive trials were made. CVI presented high interday and intraday reliability ( $r_i = 0.77$ ; 95%CI = 0.49 to 0.92 and  $r_i = 0.92$ ; 95%CI = 0.84 to 0.97,

respectively) [17]. Previous studies have shown that the CVI magnitude is not dependent on active or passive execution [24], on whether the exercise is undertaken with the lower or upper limbs [25], or even without an ergometer usage, in the orthostatic position [26]. This simple and highly reliable protocol has been used in various physiological and clinical studies [15-27].

The results of the present study are similar to those of Matsuo et al. [12], who verified the influence of the MC on the initial HR transient during the onset of exercise. They evaluated seven non-OCP users through voluntary exercise and passive movement of knee extension for 20 s. To quantify cardiac autonomic control, they used  $\Delta HR$ , calculated as the change in the absolute value of HR. In agreement with our results, they reported that HR increased similarly during exercise in both the follicular and luteal phases of the MC in non-OCP users. However, authors not used the ovulatory phase of the cycle in which estrogen concentrations were higher and progesterone levels were low. These results suggest that during the initial transient phase of exercise, no differences exist in the autonomic nervous system during the different phases of the MC. Nevertheless, other authors, who used different methodological designs, reported that the MC may change cardiac autonomic control, as discussed below.

Resting HR and blood pressure results, were not affected by the phase of the cycle in either non-OCP or OCP users. However, SBP was higher in OCP users than non-OCP users in both menstrual phases. OCP users have higher cardiovascular disease rates than non-OCP users [6], and our results corroborate this finding, as our healthy young OCP users already had higher SBP values than the non-OCP users. This fact may be due to the protective effects of female sex hormones on the cardiovascular system [3,4] because in non-OCP users,

estrogen and progesterone levels fluctuated throughout the MC, and the use of OCPs attenuates these cyclical variations (see Fig. 2).

Previous studies with different methodological designs have assessed the effects of the MC on cardiac autonomic control. Some, but not all, studies have found that endogenous estradiol and progesterone fluctuations during the MC are associated with changes in sympathetic and parasympathetic activities. Sato et al. [30] observed, through a power spectral analysis of HR variability, that sympathetic nervous system activities were predominant in the luteal phase compared with the follicular phase of the MC. Tanaka et al. [7] demonstrated that baroreflex control of HR was altered during the regular MC, and that estradiol was associated with cardiovagal modulation in 15 healthy women. McKinley et al. [31] found that resting HR was lower and HR variability was higher during the follicular phase than the luteal phase of the MC. In addition, Bai et al. [8] demonstrated through a HR variability assessment that the high-frequency components decreased from the follicular phase to the luteal phase, while the low-frequency components and the low and high-frequency ratio increased. According to these authors, the follicular phase is characterized by enhanced vagal activity and the luteal phase is characterized by enhanced sympathetic activity.

In contrast to the aforementioned results, other authors have found no significant differences in the autonomic control of HR throughout the MC. For example, Leicht et al. [9] showed that the normal cyclic variations in endogenous female hormone levels that occurred during the MC in non-OCP users were not significantly associated with changes in cardiac autonomic control as measured by HR variability. Teixeira et al. [5] compared non-OCP users and OCP users throughout the MC and found no significant differences between groups or within groups in resting HR during three different phases of the MC (follicular, ovulatory and luteal). Additionally, Middlekauf et al. [32] compared baroreceptor and non-baroreceptor control during the follicular and luteal phases of the MC in non-OCP and OCP users. The

authors used various protocols to analyze baroreceptor and non-baroreceptor control, including microneurography, baroreflex activation and deactivation, and the cold pressor test, and the results showed a significant difference only in sympathetic nerve activity, which was lower during the follicular (low ovarian hormones) compared with the luteal (high ovarian hormones) phase in non-OCP users but was not different between phases in OCP users. No significant differences were obtained in all others variables. These studies are in agreement with our observation that no differences were obtained between groups or within groups in CVI and resting cardiovascular responses.

The reason for the discrepancies between various studies is not clear, but they may be attributed to the different methods used to assess cardiac autonomic control. Potentially, a subtle and currently unrecognized difference in patient populations may underlie these discrepant findings [32]. Another factor that can explain the discrepancies between previous studies and the present study is the inclusion of only physically active women in the present study, as exercise can modify sympathetic and parasympathetic cardiac autonomic control [33]. One factor that should be considered during the analysis of the studies is to estimate the magnitude of the differences. Various methods have been described to estimate the magnitude of an ES and partial Eta squared has been shown to be the most common and appropriate method. Based on the Bayesian analysis, we must consider our results physiologically meaningful.

It is important to note the limitations of this study, such as the size of the study sample and the potential for type II error. From a more conservative standpoint the study was potentially underpowered to detect an interaction between groups and phases of the MC. In OCP users, our volunteers used several different types of OCP. Although the dosages may have been different, all OCP were combination pills, containing both synthetic estrogen and progesterone, and previous studies have used the same methodological design [5,32]. In

addition, although we used only physically active women, the level of physical fitness of each subject was not controlled. Future research should be conducted with more definitive determination of the OCP, and the inclusion of other factors such as physical fitness level and clinical status for future comparison of results and better clarification on this issue.

Previous studies have shown the protective effects of estrogen on the cardiovascular system [3,4]. Estrogen has both rapid vasodilatory effects, including enhanced nitric oxide synthesis, and longer-term actions that inhibit the response to vascular injury and prevent atherosclerosis [3]. In this context, Weissman et al. [34] demonstrated that the acute increase in estrogen level during the ovulation induction protocol is associated with vagal activation in young women. The findings in the present study do not confirm a role for endogenous or exogenous female sex hormone fluctuations in CVI at onset of exercise or in cardiovascular responses during rest in non-OCP or OCP users.

## **Conclusions**

In summary, the results of this study provide preliminary evidence that the cardiac vagal withdrawal at the onset of dynamic exercise and the resting cardiovascular variables, including HR and blood pressure are not affected by the MC and that these findings are similar between non-OCP and OCP users.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the volunteers for their cooperation in the present study. Ricardo DR was supported by CNPq – Brazil scholarships.

## References

1. Matthews KA, Crawford SL, Chae CU, Everson-Rose SA, Sowers MF, Sternfeld B, et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 2366-2373.
2. Hage FG, Oparil S. Ovarian hormones and vascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28: 411-416.
3. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340: 1801-1811.
4. Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29: 289-295.
5. Teixeira AL, Fernandes Júnior W, Moraes EM, Alves HB, Damasceno VO, Dias MR. Effects of menstrual cycle phase on resting heart rate in healthy women. *JEPonline*. 2012;15: 47-54.
6. Beller JP, McCartney CR. Cardiovascular risk and combined oral contraceptives: clinical decisions in settings of uncertainty. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208: 39-41.
7. Tanaka M, Sato M, Umehara S, Nishikawa T. Influence of menstrual cycle on baroreflex control of heart rate: comparison with male volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285: R1091-1097.
8. Bai X, Li J, Zhou L, Li X. Influence of the menstrual cycle on nonlinear properties of heart rate variability in young women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297: H765-774.

9. Leicht AS, Hirning DA, Allen GD. Heart rate variability and endogenous sex hormones during the menstrual cycle in young women. *Exp Physiol*. 2003;88: 441-446.
10. Fagraeus L, Linnarsson D. Autonomic origin of heart rate fluctuations at the onset of muscular exercise. *J Appl Physiol*. 1976;40: 679-682.
11. Magder SA. The ups and downs of heart rate. *Crit Care Med*. 2012;40: 239-245.
12. Matsuo H, Katayama K, Ishida K, Muramatsu T, Miyamura M. Effect of menstrual cycle and gender on ventilatory and heart rate responses at the onset of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2003;90: 100-108.
13. Hollander AP, Bouman LN. Cardiac acceleration in man elicited by a muscle heart reflex. *J Appl Physiol*. 1975;38: 272-278.
14. Freyschuss U. Cardiovascular adjustment to somatomotor activation. The elicitation of increments in heart rate, aortic pressure and venomotor tone with the initiation of muscle contraction. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1970;342: 1-63.
15. Araujo CG, Nobrega AC, Castro CL. Vagal activity: effect of age, sex and physical activity pattern. *Braz J Med Biol Res*. 1989;22: 909-911.
16. Araujo CG, Nobrega AC, Castro CL. Heart rate responses to deep breathing and 4-seconds of exercise before and after pharmacological blockade with atropine and propranolol. *Clin Auton Res*. 1992;2: 35-40.
17. Araujo CGS, Ricardo DR, Almeida MB. Intra and interdays reliability of the 4-second exercise test. *Rev Bras Med Esporte*. 2003;9: 293-298.

18. Vianna LC, Oliveira RB, Silva BM, Ricardo DR, Araujo CG. Water intake accelerates post-exercise cardiac vagal reactivation in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2008;102: 283-288.
19. Knopfli BH, Bar-Or O. Vagal activity and airway response to ipratropium bromide before and after exercise in ambient and cold conditions in healthy cross-country runners. *Clin J Sport Med.* 1999;9: 170-176.
20. Ricardo DR, Almeida MB, Franklin BA, Araujo CG. Initial and final exercise heart rate transients: influence of gender, aerobic fitness, and clinical status. *Chest.* 2005;127: 318-327.
21. Ricardo DR, Silva BM, Vianna LC, Araujo CG. Cardiac vagal withdrawal and reactivation during repeated rest-exercise transitions. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110: 933-942.
22. Oliveira RB, Vianna LC, Ricardo DR, Almeida MB, Araujo CG. Influence of different respiratory maneuvers on exercise-induced cardiac vagal inhibition. *Eur J Appl Physiol.* 2006;97: 607-612.
23. Millar PJ, MacDonald MJ, Bray SR, McCartney N. Isometric handgrip exercise improves acute neurocardiac regulation. *Eur J Appl Physiol.* 2009;107: 509-515.
24. Nóbrega AC, Araújo CG. Heart rate transient at the onset of active and passive dynamic exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25: 37-41.
25. Araújo CG, Nóbrega AC, Castro CL. Similarities between fast initial heart rate response to arm and leg cycling exercise [abstract]. *J Cardiopulm Rehabil.* 1993;13: 348.

26. Almeida MB, Ricardo DR, Araújo CG. Validation of the 4-second exercise test in the orthostatic position. *Arq Bras Cardiol.* 2004;83: 160-164.
27. Teixeira AL, Ramos PS, Marins JB, Ricardo DR. The role of water intake on cardiac vagal reactivation after upper-body resistance exercise. *Int J Sports Med.* 2014; [ahead of print] Doi: 10.1055/s-0034-1389971.
28. Miles J, Shevlin M. *Applying Regression and Correlation: A Guide for Students and Researchers.* Sage: London. 2001.
29. Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Erlbaum. 1988.
30. Sato N, Miyake S, Akatsu J, Kumashiro M. Power spectral analysis of heart rate variability in healthy young women during the normal menstrual cycle. *Psychosom Med.* 1995;57: 331-335.
31. McKinley PS, King AR, Shapiro PA, Slavov I, Fang Y, Chen IS, et al. The impact of menstrual cycle phase on cardiac autonomic regulation. *Psychophysiology.* 2009;46: 904-911.
32. Middlekauff HR, Park J, Gornbein JA. Lack of effect of ovarian cycle and oral contraceptives on baroreceptor and nonbaroreceptor control of sympathetic nerve activity in healthy women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302: H2560-2566.
33. Mairer K, Wille M, Grander W, Bartscher M. Effects of exercise and hypoxia on heart rate variability and acute mountain sickness. *Int J Sports Med.* 2013;34: 700-706.

34. Weissman A, Lowenstein L, Tal J, Ohel G, Calderon I, Lightman A. Modulation of heart rate variability by estrogen in young women undergoing induction of ovulation. *Eur J Appl Physiol.* 2009;105: 381-386.

**Anexo C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

*Pesquisador responsável*

*Nome: André Luiz da Silva Teixeira*

*Cel: (32) 8886-8184 E-mail: andre\_teixeira@ymail.com*

A Sra. está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa: **Influência do ciclo menstrual no controle da frequência cardíaca**. Neste estudo pretendemos verificar se as diferentes fases do ciclo menstrual modificam a resposta da frequência cardíaca no repouso e na transição repouso-exercício.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: inicialmente, iremos verificar seu peso, estatura e as medidas em repouso da frequência cardíaca e pressão arterial. Posteriormente, você realizará o teste de exercício de quatro segundos (T4s) em três dias distintos, sendo um em cada fase do ciclo menstrual (durante a menstruação, 14 e 21 dias depois, aproximadamente). O T4s consiste em pedalar o mais rápido possível uma bicicleta ergométrica sem carga durante quatro segundos em apnéia inspiratória de 12 segundos. A determinação das fases do ciclo menstrual será confirmada através dos níveis hormonais de estrogênio e progesterona por um exame de sangue. Para tal, uma enfermeira com experiência prévia irá realizar todos os procedimentos, que consistem na retirada de 5 mL de sangue de seu braço.

Para participar, você passará por um processo de inclusão e todos os procedimentos serão realizados por um profissional da área da Saúde.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

A Sra. não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora (SUPREMA) e a outra será fornecida a você.

Eu, \_\_\_\_\_, portadora do RG nº. \_\_\_\_\_, fui informada dos objetivos deste estudo, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Nome

Assinatura da participante

---

Nome

Assinatura do pesquisador