

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-graduação em Medicina: Cardiologia**

***VALIDAÇÃO DO MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL COMO  
MÉTODO DE ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA  
CARDÍACA E DA PRESSÃO ARTERIAL***

**Tese de Doutorado**

**Autor: Ruy Silveira Moraes Filho**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen**

**Porto Alegre, agosto de 1999.**

Dedico esta tese à minha esposa Helena e aos meus filhos Ana Carolina e Lucas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao amigo, colega e orientador Dr. Jorge Pinto Ribeiro por ter me ajudado a crescer intelectualmente e a adquirir confiança para desenvolver o meu trabalho de forma mais independente.

À Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen pela sua co-orientação eficiente e pelo entusiasmo com que se envolveu com o nosso trabalho.

Ao físico e engenheiro eletrônico Elton L. Ferlin, pela sua parceria constante em todos os momentos. Sem a sua amizade, interesse científico e capacitação técnica, sempre voltado para a excelência, esta linha de pesquisa não existiria como tal.

Ao Dr. Décio Faraco de Azevedo por manter as portas da Unidade de Métodos Não Invasivos sempre abertas para a pesquisa.

Ao Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, na figura do seu chefe, o Dr. Jorge Luiz Gross pela colaboração na execução dessa tese, fruto do trabalho de equipe que vem sendo realizado nos últimos anos com o Serviço de Cardiologia.

À Dra. Carísi A. Polanczyk pela sua colaboração e incentivo em todos os momentos desta tese.

Aos colegas Dr. Luis Eduardo Rohde e Dra. Cristina Leite pelo auxílio na execução do estudo de bloqueio farmacológico.

Ao Dr. Edson Dias Moreira, do Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração, pertencente à Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, pela execução da desnervação sinoaórtica.

Ao Dr. Eberton Timm, pelo auxílio na coleta dos dados experimentais em ratos.

Os trabalhos apresentados nesta tese foram desenvolvidos com a ajuda da CAPES, através de bolsa de doutorado e com suporte financeiro fornecido pela Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela FAPERGS e pelo PRONEX.

## RESUMO

**Introdução** - A variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial são habitualmente estudadas através de métodos lineares, nos domínios do tempo e da frequência. Recentemente, métodos não-lineares, como o mapa de retorno, foram aplicados com sucesso na cardiologia.

**Objetivos** - Avaliar o desempenho de uma modificação do mapa de retorno clássico, denominado mapa de retorno tridimensional, para detectar (1) diferentes níveis de disfunção autonômica, (2) a reprodutibilidade, (3) a modulação parassimpática e simpática sobre o nó sinusal e (4) o efeito dos pressorreceptores e quimiorreceptores sobre a variabilidade da pressão arterial.

**Material e métodos** - Para estudar a frequência cardíaca, o mapa de retorno tridimensional foi construído a partir dos intervalos RR do eletrocardiograma, como  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus densidade. Desenvolvemos 4 índices de quantificação:  $P_1$  - inversamente proporcional à inclinação da máxima densidade de pontos;  $P_2$  - máximo comprimento longitudinal;  $P_3$  - máxima largura transversal; MN - produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . Estudamos 22 pacientes diabéticos, sendo 10 com neuropatia autonômica e 12 sem neuropatia autonômica, diagnosticada por 5 testes autonômicos cardiovasculares, e 12 indivíduos normais. A reprodutibilidade foi avaliada em 9 pacientes diabéticos e 10 indivíduos normais, em 2 dias consecutivos. Estudamos a correlação dos índices do mapa de retorno tridimensional com os índices no domínio do tempo raiz quadrada média das diferenças sucessivas (RMSSD), desvio padrão dos intervalos (SDNN) e desvio padrão das médias dos intervalos RR calculadas em segmentos de 5 minutos (SDANNi). Estudamos, em 6 indivíduos normais, o efeito do bloqueio farmacológico com propranolol e atropina sobre o mapa de retorno tridimensional, durante um protocolo de uma hora, incluindo 40 minutos em repouso e 20 minutos de exercício. Em ratos, estudamos o efeito da desnervação sinoaórtica sobre o mapa de retorno tridimensional de pressão arterial, construído como  $PA_n \times [(PA_{n+1})-(PA_n)] \times$  densidade. Foram estudados 10 ratos Wistar, sendo 5 deles submetidos à desnervação sinoaórtica. Para auxiliar na interpretação dos resultados, construímos gráficos de fase da pressão arterial ( $PA_n \times dPA_n/dt$ ). Foi ainda calculado o desvio padrão da pressão arterial.

**Resultados** - Os índices do mapa de retorno tridimensional foram capazes de diferenciar pacientes com disfunção autonômica de indivíduos normais.  $P_1$  e MN diferenciaram cada um dos 3 grupos estudados (ANOVA  $p < 0,05$ ). A maioria dos índices do mapa de retorno tridimensional apresentou melhor acurácia total na detecção de disfunção autonômica do que os índices no domínio do tempo, calculada pela área sob a curva ROC. Com exceção de  $P_1$ , os demais índices do mapa de retorno tridimensional correlacionaram-se com os índices no domínio do tempo (todos  $p < 0,01$ ). Os índices do mapa de retorno tridimensional apresentaram reprodutibilidade adequada em dois dias consecutivos (coeficientes de correlação intra-classe entre 0,69 a 0,82;  $p < 0,01$ ). Em comparação ao placebo, o bloqueio simpático com propranolol aumentou  $P_1$  e MN e o bloqueio parassimpático e o duplo-bloqueio diminuíram  $P_2$ ,  $P_3$  e MN (ANOVA  $p < 0,05$ ). Em relação aos achados de variabilidade da pressão arterial, tanto a média, como os valores de  $P_1$  e  $P_3$

das pressões arteriais sistólica, diastólica e média foram semelhantes nos ratos íntegros e nos ratos desnervados. O desvio padrão,  $P_2$  e MN foram maiores nos ratos desnervados, quando comparados aos ratos íntegros (teste t  $p < 0,05$ ). O índice global MN revelou maior variabilidade da pressão arterial sistólica, quando comparada à diastólica (teste t pareado  $p < 0,05$ ).

**Conclusões** - Os índices do mapa de retorno tridimensional de frequência cardíaca detectam disfunção autonômica em pacientes diabéticos, são reprodutíveis, correlacionam-se com os índices no domínio do tempo e quantificam a modulação parassimpática e simpática sobre o nó sinusal. Os índices do mapa de retorno tridimensional de pressão arterial detectam diferenças no comportamento da pressão arterial, secundárias à eliminação dos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais, os quais parecem modular as pressões arteriais sistólica e diastólica de forma distinta.

## ABSTRACT

**Introduction** - Heart rate and blood pressure variability are usually studied by linear methods in time- and in frequency-domain. Recently, non-linear methods return maps have also been successfully used in cardiology.

**Objectives** - To evaluate the performance of a modified return map, called three-dimensional return map, (1) to detect different levels of autonomic dysfunction, (2) to evaluate the reproducibility of the method, (3) to detect parasympathetic and sympathetic modulation to the sinus node and (4) to detect the influence of baroreceptors and chemoreceptors over blood pressure variability.

**Material and methods** - For heart rate studies three-dimensional return map was built from the RR intervals of the electrocardiogram plotting  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus density. Quantification indices were created:  $P_1$  - inversely proportional to the slope of the maximum density;  $P_2$  - maximal longitudinal length;  $P_3$  - maximal transversal length; MN - the product of  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . Twenty-two diabetic patients, 10 with autonomic neuropathy and 12 without autonomic neuropathy, according to 5 cardiovascular autonomic tests, and 12 normal individuals were studied. Reproducibility was evaluated in 9 diabetic patients and 10 normal individuals during two consecutive days. Correlation of three-dimensional return map indices to time domain indices root mean square successive difference (RMSSD), standard deviation of RR intervals (SDNN) and standard deviation of the mean RR interval calculated in 5 min segments (SDANNi) were calculated. In six healthy subjects we studied the effect of partial and total pharmacological blockade with propranolol and atropine on three-dimensional return map, during a 1-hour protocol which included 40 minutes of rest and 20 minutes of exercise. In rats, we studied the effect of sinoaortic denervation on arterial blood pressure (AP) variability using a three-dimensional return map constructed as  $AP_n \times [(AP_{n+1})-(AP_n)] \times$  density. Of the ten Wistar rats studied, five were submitted to sinoaortic denervation. To collaborate in data interpretation phase-plane plots ( $AP_n \times dAP_n/dt$ ) were constructed. Blood pressure standard deviation was also calculated.

**Results:** Three-dimensional return map indices detected differences between patients with autonomic dysfunction and normal controls.  $P_1$  and MN differentiated each one of the 3 groups studied (ANOVA  $p < 0,05$ ). Overall accuracy of most three-dimensional return map indices to detect autonomic dysfunction, estimated by the area under the ROC curve, was significantly better than traditional time-domain indices. All three-dimensional return map indices but  $P_1$  were correlated to time-domain indices (all  $p < 0.01$ ). Three-dimensional return map indices also showed adequate reproducibility in two different recording days (intra-class correlation coefficient of 0.69 to 0.82;  $p < 0.01$ ). Compared to placebo, both  $P_1$  and MN were increased after sympathetic blockade with propranolol, while all indices except  $P_1$  were modified after parasympathetic blockade ( $p < 0.05$ ). Considering our blood pressure variability results, denervated and non-denervated rats had similar values of mean systolic, diastolic and mean arterial pressure as well as  $P_1$  and  $P_3$ . Denervated rats presented higher values of standard deviation,  $P_2$  and MN, comparing to non-denervated rats (t test  $p < 0.05$ ). Global index MN showed higher values for systolic blood pressure, comparing to diastolic (paired t test  $p < 0.05$ ).

**Conclusions** – Heart rate three-dimensional return map indices detected autonomic dysfunction in diabetic patients, reproducible, correlated to time-domain indices and are able to quantify parasympathetic and sympathetic modulation to the sinus node. Blood pressure three-dimensional return map indices detected differences in blood pressure behavior secondary to baroreceptor and chemoreceptor elimination, suggesting that baroreceptors and chemoreceptors modulate systolic and diastolic blood pressure in different ways.



## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I</b> .....	3
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	3
<i>REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR</i> .....	3
Desnervação sinoaórtica .....	6
<i>MÉTODOS DE ANÁLISE DAS OSCILAÇÕES CARDIOVASCULARES BATIMENTO A BATIMENTO</i> 9	
Domínio da frequência .....	9
<i>Representação autonômica dos componentes de frequência da análise espectral</i> .11	
<i>Análise espectral da pressão arterial</i> .....	12
<i>Análise espectral da frequência cardíaca</i> .....	12
Métodos no domínio do tempo .....	14
Avaliação dinâmica da atividade barorreflexa .....	18
Métodos não-lineares .....	20
<b>CAPÍTULO II</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>CAPÍTULO III</b> .....	24
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<i>ESTUDO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA DIABÉTICA</i> .....	25
<i>ESTUDO DE BLOQUEIO FARMACOLÓGICO</i> .....	26
<i>ÍNDICES DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO</i> .....	28
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL</i> .....	28
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	31
<i>ESTUDO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA DIABÉTICA</i> .....	31
<i>REPRODUTIBILIDADE</i> .....	35
<i>ESTUDO COM BLOQUEIO FARMACOLÓGICO</i> .....	36
<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL VERSUS BIDIMENSIONAL</i> .....	39
<i>DETECÇÃO DA MODULAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA SOBRE O NÓ SINUSAL</i> .....	40
<i>CORRELAÇÃO COM OS ÍNDICES NO DOMÍNIO DO TEMPO</i> .....	42
<i>DETECÇÃO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA EM PACIENTES DIABÉTICOS</i> .....	43
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	45
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
<i>CATETERIZAÇÃO DE VASOS</i> .....	46
<i>REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL</i> .....	47
<i>DESNERVAÇÃO SINOAÓRTICA</i> .....	48
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL</i> .....	49
<i>GRÁFICOS DE FASE</i> .....	49
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	51
<i>VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL</i> .....	54

GRÁFICOS DE FASE.....	54
DISCUSSÃO.....	61
<i>DESNERVAÇÃO SINOÁORTICA</i> .....	61
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL</i> .....	61
<i>VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA VERSUS DIASTÓLICA</i> .....	63
<b>CAPÍTULO V</b> .....	66
DISCUSSÃO GERAL.....	66
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL DA FREQUÊNCIA CARDÍACA</i> .....	67
<i>MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL DA PRESSÃO ARTERIAL</i> .....	70
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	74
CONCLUSÕES.....	74
<b>Anexo 1 – Termo de Consentimento</b> .....	75
<b>Anexo 2 – Termo de Consentimento</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	78

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

#### *REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR*

O funcionamento dos sistemas biológicos é o resultado da interação entre diversos mecanismos regulatórios, que comandam um número quase infindável de variáveis. Como, na sua grande maioria, estes mecanismos são inacessíveis aos pesquisadores, o conhecimento sobre estes sistemas baseia-se, em grande parte, na análise do comportamento das suas variáveis. No caso do sistema cardiovascular, o estudo do comportamento das variáveis pressão arterial e frequência cardíaca tem permitido o acesso a alguns dos mecanismos regulatórios (1). Apesar dos métodos de análise atualmente empregados fornecerem apenas uma visão limitada de um sistema que é muito complexo, a informação obtida a partir do estudo das oscilações da pressão arterial e da frequência cardíaca batimento a batimento (2, 3, 4) mostrou ter comprovada relevância clínica (5, 6, 7). Em função disso, nos últimos anos, observa-se um interesse crescente no desenvolvimento de novos métodos que possam descrever o comportamento das oscilações cardiovasculares, de forma mais abrangente.

A regulação do sistema cardiovascular é tradicionalmente descrita como sendo homeostática, com o objetivo de manter a pressão arterial estável. Sempre que ocorre alguma perturbação, são ativados mecanismos que procuram trazer o sistema para um determinado valor médio preferencial de pressão arterial, usualmente chamado de ponto de ajuste da pressão arterial. Os principais reguladores da pressão arterial batimento a

batimento são os mecanismos neuro-humorais. Os pressorreceptores arteriais, os quimiorreceptores arteriais e os receptores cardiopulmonares, modulados por centros integrativos do tronco cerebral, atuam sobre o débito cardíaco e a resistência vascular periférica, assegurando uma pressão de perfusão adequada para os diferentes tecidos, com especial atenção para os tecidos cerebrais. Dentre os fatores neuro-humorais, a ação exercida pelos pressorreceptores arteriais é considerada a principal responsável pela regulação instantânea da pressão arterial.

Os pressorreceptores são mecanorreceptores localizados na crossa da aorta e no seio carotídeo, sensíveis à deformação da parede arterial determinada pela onda de pulso. São terminações de fibras aferentes nervosas densamente ramificadas. Elas dão origem ao nervo depressor aórtico e ao nervo sinusal, que se unem respectivamente ao vago e ao glossofaríngeo. No nível central, estas fibras se projetam para centros integrativos, representados pelo núcleo do trato solitário e partes rostral e caudal do bulbo ventromedial. Os neurônios secundários do núcleo do trato solitário excitam os neurônios pré-ganglionares do parassimpático, no núcleo dorsal motor do vago. Seus eferentes vagais projetam-se diretamente aos neurônios pós-ganglionares intramurais, situados no coração e outros órgãos. Outros interneurônios do núcleo do trato solitário projetam-se ao centro vasomotor no bulbo ventrolateral, que atua no controle tônico da pressão arterial. Os interneurônios do núcleo do trato solitário, uma vez excitados pelos pressorreceptores, inibem o tono simpático. O tono simpático é capaz de alterar a frequência cardíaca, a contratilidade miocárdica, a atividade dos vasos de resistência e de capacitância, além de induzir a liberação de catecolaminas e de renina.

Sucintamente, o mecanismo se processa da seguinte forma. Em decorrência de uma

queda da pressão arterial, ocorre menor deformação dos mecanorreceptores aórticos e carotídeos, resultando em menor estimulação dos interneurônios do núcleo do trato solitário, promovendo menor estimulação vagal e liberação da estimulação simpática (8). Isto aumenta a liberação de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal, bem como de vasopressina pela neuro-hipófise. A diminuição da pressão de perfusão renal, resultante da queda da pressão, somada ao aumento da atividade simpática, aumentam a liberação de renina. Desta seqüência de eventos, resultam o aumento da frequência cardíaca, da contratilidade miocárdica, da resistência vascular periférica, do retorno venoso, do débito cardíaco e da volemia central, fazendo com que os níveis pressóricos retornem ao seu ponto de ajuste. Em caso de aumento da pressão arterial, o mecanismo se processa de forma oposta. Uma maior deformação dos pressorreceptores promove elevação do tono vagal e inibição do tono simpático. Isto resulta em diminuição da frequência cardíaca, do volume sistólico, da liberação de catecolaminas e de renina, da resistência vascular periférica, do retorno venoso e do débito cardíaco, reduzindo os níveis pressóricos de volta ao seu ponto de ajuste.

Os quimiorreceptores são grupamentos celulares localizados nos corpúsculos aórticos e carotídeos, com terminais nervosos, cujas fibras aferentes juntam-se ao vago e ao glossofaríngeo até o núcleo do trato solitário. Eles apresentam a capacidade de detectar alterações na pressão parcial, tanto de oxigênio como de gás carbônico, bem como em flutuações do pH sanguíneo. A atividade destes receptores aumenta com a diminuição da pressão parcial de oxigênio, com o aumento da pressão parcial de gás carbônico e redução do pH. Eles estimulam reflexamente os centros respiratórios, produzindo taquipnéia, e os centros cardiovasculares, produzindo bradicardia e hipertensão. Este aumento da pressão

arterial resulta de vasoconstrição simpática, com aumento da resistência vascular periférica e da secreção da medula adrenal (9).

O controle circulatório dependente da atividade barorreflexa é tradicionalmente estudado pela análise simultânea da resposta da pressão arterial e da frequência cardíaca a manobras que desestabilizam o sistema. Estas manobras podem se dar através da administração de drogas vasoativas (10), ou da manipulação da região carotídea (pressão ou sucção) por colar cervical (11). A atividade barorreflexa é expressa como a inclinação da reta de regressão linear entre o intervalo de pulso e a pressão arterial, calculada a partir da execução da manobra (12).

### **Desnervação sinoaórtica**

A eliminação dos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais, através do modelo experimental de desnervação sinoaórtica, descrito por Krieger (13), permite estudar a ação dos pressorreceptores sobre a modulação da pressão arterial, da frequência cardíaca e da atividade nervosa simpática renal. Ao empregar este modelo para o estudo do controle da pressão arterial pela atividade barorreflexa, é fundamental certificar-se de que a desnervação tenha sido feita de forma completa. As alterações na regulação cardiovascular, após a desnervação sinoaórtica, dependem do grau de desnervação obtido, sendo necessário testar a sensibilidade barorreflexa dos animais desnervados para assegurar o sucesso do procedimento (14).

Após a desnervação, os pressorreceptores deixam de estimular o sistema nervoso parassimpático e liberam a atividade tônica inibitória sobre o centro vasomotor medular,

levando ao surgimento de um quadro de hiperatividade simpática. A síntese de dopamina, noradrenalina e adrenalina pela medula adrenal está ativada nos primeiros 3 dias pós-desnervação, diminuindo após 21 dias (15).

Em ratos, a liberação do simpático promove, já nas primeiras 6 horas, aumento progressivo da pressão arterial, da frequência cardíaca e da atividade nervosa simpática renal. O aumento da pressão arterial é consequência de aumento da resistência vascular periférica, pela liberação de catecolaminas, que pode ser evitada pela associação de demedulação adrenal mais uso de guanetidina, ou revertida pelo bloqueio autonômico completo (16). Os níveis pressóricos, aumentados na fase aguda, retornam aos valores de controle após 20 dias, com redução da hiperatividade simpática (17, 18).

A hiperatividade do sistema renina-angiotensina também colabora no aumento da pressão arterial após desnervação, por efeito vasoconstritor direto, de forma indireta por estimulação simpática central e periférica, ou por estimular a secreção de vasopressina. Os níveis vasopressina também aumentam em decorrência da eliminação da influência inibitória tônica secundária à desnervação sinoaórtica (19).

A eliminação dos pressorreceptores promove um grande aumento na variabilidade da pressão arterial batimento a batimento, evidenciado pelo aumento no desvio padrão da pressão arterial média. Apesar de diversos mecanismos serem responsabilizados pelo aumento da variabilidade da pressão arterial na desnervação sinoaórtica, este comportamento ainda está longe de ser completamente compreendido. Até o momento, a hiperatividade simpática resultante da desnervação sinoaórtica tem sido apontada como a principal responsável por este comportamento (20). A atividade nervosa simpática renal está aumentada na fase mais precoce da desnervação sinoaórtica (21), reduzindo-se na fase mais

tardia. Há evidências de que a maior variabilidade, no rato desnervado, possa ser conseqüência da perda de sincronia entre a atividade simpática renal e a pressão arterial (22).

As respostas pressóricas exageradas a estímulos comportamentais (23, 24), ou a inspirações profundas (25, 26) podem gerar alterações abruptas da pressão arterial no rato desnervado. O somatório destas respostas, ao longo do tempo, pode determinar o aumento na média e na variabilidade da pressão arterial (13, 27).

Através de bloqueio farmacológico, foi possível demonstrar que o aumento na atividade do sistema renina-angiotensina e da vasopressina, desencadeado pela retirada dos pressorreceptores, também colabora para a variabilidade da pressão arterial (28, 29), atuando de forma direta sobre a modulação dos leitos vasculares periféricos (30).

Outra explicação para o aumento da variabilidade da pressão arterial após a eliminação dos quimiorreceptores e dos pressorreceptores é que, em situação fisiológica, eles influenciam a pressão arterial de forma oposta. Como a eliminação dos quimiorreceptores promove hipotensão e a ausência dos pressorreceptores promove hipertensão, o resultado final pode ser um aumento da variabilidade da pressão arterial (31). Na fase aguda (24 horas) da desnervação sinoaórtica, os efeitos da desnervação dos pressorreceptores promovem aumento da atividade simpática e da pressão arterial. Na fase crônica (20 dias), a normalização da pressão arterial e da atividade simpática renal refletem um balanço entre os efeitos opostos da desnervação dos pressorreceptores e dos quimiorreceptores (22).



## ***MÉTODOS DE ANÁLISE DAS OSCILAÇÕES CARDIOVASCULARES BATIMENTO A BATIMENTO***

A ação dos mecanismos de controle cardiovascular, apesar de manter a estabilidade média do sistema, não impede que ocorram flutuações da frequência cardíaca e da pressão arterial batimento a batimento. Através do estudo destas oscilações, é possível conhecer melhor os mecanismos de regulação do sistema cardiovascular. Os métodos utilizados para avaliar o comportamento destas oscilações podem ser no domínio da frequência ou no domínio do tempo.

### **Domínio da frequência**

Os métodos no domínio da frequência conseguem individualizar e quantificar os diferentes componentes de frequência de uma oscilação complexa. A análise espectral é o método no domínio da frequência mais utilizado, tendo se tornado um valioso instrumento na avaliação do sistema cardiovascular. A potência espectral encontrada para uma dada frequência representa a contribuição daquela frequência, em particular, para a variabilidade total da variável em estudo.

No estudo da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial, usualmente este método identifica oscilações em 3 bandas de frequência. Essas oscilações podem ser classificadas como sendo de alta frequência, entre 0,2 a 0,4 Hz, de média frequência, ao redor de 0,1 Hz, e de baixa frequência, entre 0,02 a 0,07 Hz (32).

As oscilações de alta frequência coincidem com a frequência respiratória, podendo ser identificadas tanto em séries temporais de frequência cardíaca, como de pressão arterial,

mas por mecanismos distintos. A oscilação da frequência cardíaca secundária à respiração, conhecida como arritmia sinusal respiratória, é um fenômeno mediado pelo vago, através de estímulos diretos dos centros respiratórios cerebrais, mas que depende também de reflexos cardiopulmonares. Este é um dos mecanismos propostos para a modulação da frequência cardíaca pela respiração: 1) variações cíclicas da pressão intra-aórtica, produzidas pela respiração, alteram mecanicamente o retorno venoso e as circulações pulmonar e aórtica, que, por ação central, repercutem sobre a frequência cardíaca via pressorreceptores arteriais ou receptores atriais; 2) receptores pulmonares e da parede torácica, sensíveis à frequência respiratória e ao volume de ar corrente, diminuem a amplitude das oscilações da frequência cardíaca, com o aumento da frequência respiratória e aumentam a amplitude das oscilações da frequência cardíaca, com o aumento do volume de ar corrente; 3) os neurônios respiratórios medulares exercem modulação direta sobre os neurônios cardiomotores (32, 33). O papel da modulação central parece ser fundamental. Mesmo sem a presença dos movimentos respiratórios e das flutuações da pressão arterial, não é possível eliminar completamente a arritmia sinusal respiratória, se persistir a atividade inspiratória central. Por outro lado, a arritmia sinusal respiratória desaparece com a depressão do centro respiratório (33).

Ao contrário da frequência cardíaca, a modulação autonômica não exerce um papel relevante sobre o efeito da respiração sobre os componentes de alta frequência da pressão arterial. Em ratos, a potência desses componentes permanece inalterada com bloqueio simpático e pode até aumentar com o bloqueio vagal com atropina (34). As oscilações de alta frequência sobre a pressão arterial são consequência dos efeitos mecânicos da respiração sobre os gradientes pressóricos, repercutindo sobre o tamanho e a função do

coração e dos grandes vasos (1).

As oscilações de média e baixa frequência estão associadas às flutuações do tônus vasomotor e à resistência vascular periférica. No caso específico da pressão arterial, os componentes de frequência ao redor de 0,1 Hz correspondem às oscilações na pressão arterial sistêmica com 6 a 9 ciclos por minuto, conhecidas como ondas de Mayer. Estas oscilações também se manifestam no comportamento da frequência cardíaca, em decorrência de mecanismos periféricos ou centrais. Segundo Akselrod et al. (32), essas oscilações poderiam ser explicadas pelo envolvimento dos pressoreceptores no controle da resistência vascular periférica, a qual responde com um retardo temporal ao redor de 3 segundos (0,05 Hz). Defendendo um mecanismo central, Preiss et al. sugerem que a modulação rítmica da atividade neuronal simpática, responsável pelas ondas de Mayer, é dependente de um oscilador no sistema nervoso central, que poderia ser modulado, em parte, pelos pressoreceptores (35).

Os mecanismos regulatórios, responsáveis pelos componentes de frequência entre 0,025 e 0,07 Hz, parecem estar associados ao sistema renina-angiotensina, a fatores endoteliais, termorregulação e outros ainda não bem esclarecidos (32).

### ***Representação autonômica dos componentes de frequência da análise espectral***

O estudo das oscilações da pressão arterial e da frequência cardíaca ganhou grande impulso nos últimos anos, como forma de representar indiretamente a participação do sistema nervoso autônomo sobre a regulação cardiovascular. Foram desenvolvidos estudos em animais e em humanos, tentando correlacionar cada uma das bandas de frequência da

análise espectral com os ramos do sistema nervoso autônomo.

### *Análise espectral da pressão arterial*

Apesar de informar sobre o comportamento da pressão arterial batimento a batimento, a representação autonômica da análise espectral da pressão arterial ainda é muito controversa. Em relação aos componentes de alta frequência, parece não haver muita dúvida. Apesar de ocorrerem oscilações resultantes dos movimentos respiratórios, elas não dependem da modulação autonômica, como acontece com a frequência cardíaca (36, 37). Portanto, não é possível avaliar nenhum ramo do sistema nervoso autônomo a partir deles. Já os componentes de baixa frequência dependem em cerca de 80% da regulação vascular exercida pelo sistema nervoso simpático (38), correlacionando-se inversamente com a atividade barorreflexa (39). Eles estão elevados durante situações que exacerbam a atividade simpática e (40, 41) diminuídos após a redução da atividade simpática (32, 42, 34). Apesar destas evidências, ainda não foi demonstrado que exista uma correlação entre os componentes de baixa frequência e o nível médio de modulação simpática (38, 1).

### *Análise espectral da frequência cardíaca*

Em relação à frequência cardíaca, sabe-se que os componentes de alta frequência podem ser usados como expressão isolada da modulação vagal sobre o nó sinusal. Estes componentes são praticamente eliminados por intervenções que diminuem a atividade vagal e (3, 43, 41) são aumentados por intervenções que exacerbam o tono vagal, como a

administração de escopolamina (44). Contudo, eles não representam a média da atividade vagal no período estudado, mas o resultado das flutuações da modulação vagal (45). Sem que haja modulação pelo sistema nervoso central proporcionando flutuações adaptativas no tono vagal, isoladamente, a estimulação direta e constante do nervo vago não consegue produzir aumento nos componentes de alta frequência da análise espectral.

Os componentes de baixa frequência são influenciados tanto pela modulação simpática como pela modulação vagal (3). Foi demonstrado que estes componentes aumentam durante algumas intervenções em laboratório, que sabidamente aumentam a atividade simpática (41). Nessas circunstâncias, o método tem sido empregado com sucesso. As evidências em relação à participação simpática na gênese destes componentes, quando são avaliados durante o repouso (46, 1, 47, 48, 49) ainda são controversas (5).

A eficiência da análise espectral, tanto de pressão como de frequência cardíaca, é especialmente dependente da estacionaridade do sinal analisado e da ausência de artefatos (50). A presença de batimentos ectópicos e artefatos obscurecem a atividade normal do nó sinusal, fazendo com que os batimentos imediatamente antes e imediatamente depois da ectopia sejam excluídos da análise espectral (51). A presença de um único batimento ectópico pode contaminar o espectro de frequência, dificultando a interpretação (52). Quando o número de ectopias ou de artefatos é excessivo, não é possível obter uma análise confiável da série temporal. É mais difícil a interpretação dos dados nas análises de 24 h, quando há muito mais probabilidade de contaminação do espectro de frequência e perda de estacionaridade (53). Mesmo assim, independente da qualidade da série temporal, a análise espectral não oferece informações confiáveis sobre a modulação de cada um dos ramos autonômicos, quando os períodos de análise são prolongados (5). Além da eventual

contaminação por artefatos, o controle da respiração pode ser crucial para a avaliação dos componentes de baixa frequência. Uma frequência respiratória inferior a 9 ciclos por minuto desloca para a esquerda o componente de alta frequência, impossibilitando a correta interpretação dos resultados. Este tipo de controle é muito difícil de fazer por períodos longos de tempo.

### **Métodos no domínio do tempo**

Outra forma de avaliar o comportamento das oscilações cardiovasculares é calcular a dispersão em torno da média da pressão arterial ou da frequência cardíaca. Por levarem em consideração o fator tempo e não o fator frequência, como na análise espectral, os índices derivados deste tipo de abordagem são conhecidos como índices no domínio do tempo. Apesar de traduzirem de forma muito simplificada o complexo comportamento do sistema cardiovascular, estes índices fornecem informações relevantes.

Antes da era dos computadores, Ewing et al. padronizaram um conjunto de testes para avaliar a integridade do sistema nervoso autônomo, baseados nas respostas da frequência cardíaca e da pressão arterial a estímulos padronizados (54). De uma forma geral, os testes que avaliam a variação da frequência cardíaca referem-se à integridade do sistema nervoso parassimpático e os que avaliam a variação da pressão arterial, ao sistema nervoso simpático (55). Apesar de serem muito usados na prática clínica e em laboratório, ainda há dúvidas quanto à escolha do melhor teste (56, 57, 58). Além disto, eles apresentam problemas de padronização (59), a sensibilidade e a reprodutibilidade são baixas (60), existe a necessidade de cooperação por parte do paciente (61) e eles fornecem informação exclusivamente sobre um período restrito de tempo (62).

Após o advento dos computadores, inúmeros índices começaram a ser calculados, utilizando períodos mais longos de tempo (5). Dentre os novos índices disponíveis, o desvio padrão é o mais simples de calcular em uma série temporal de pressão arterial ou de frequência cardíaca.

O desvio padrão da pressão arterial batimento a batimento é empregado para quantificar a integridade dos sistemas de controle da pressão arterial (31). Quando os mecanismos de controle estão íntegros, ocorrem menos oscilações da pressão arterial (14), com valores menores de desvio padrão. Um desvio padrão da pressão arterial elevado indica comprometimento na homeostase cardiovascular. O cálculo do desvio padrão, contudo, não permite indentificar quais mecanismos encontram-se comprometidos. Apesar de ser muito usado em modelo animal, o desvio padrão da pressão arterial não costuma ser utilizado na prática clínica.

Ao contrário da pressão arterial, o estudo da variabilidade da frequência cardíaca através dos índices no domínio do tempo é amplamente utilizado na prática clínica. Os diferentes métodos são calculados utilizando-se apenas os intervalos RR normais, desprezando-se os artefatos e as ectopias. Os índices mais popularizados até o momento, com as suas abreviações conhecidas internacionalmente, são os seguintes:

- . desvio padrão de todos intervalos RR normais (SDNN);
- . média dos desvios padrão dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos (SDNNi);
- . desvio padrão das médias dos intervalos RR normais calculadas em intervalos de 5 minutos (SDANNi);
- . raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais

adjacentes, também chamada de raiz quadrada média das diferenças sucessivas (RMSSD);

. percentagem das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes que excedem a 50 milissegundos (PNN50).

O significado fisiológico destes índices, quando calculados por períodos longos de tempo, tem sido estudado basicamente através da correlação com os achados da análise espectral (63, 64, 65, 66). De uma forma geral, todos eles correlacionam-se com os componentes de alta frequência, mas não permitem distinguir quando as alterações da variabilidade da frequência cardíaca são devidas a um aumento do tônus simpático ou a uma retirada do tônus vagal. Entre eles, RMSSD e PNN50 são os que apresentam melhor correlação com os componentes entre 0,15 e 0,4 Hz do espectro de frequência, traduzindo melhor a modulação vagal (67, 65, 44) SDNN e SDANNi correlacionam-se bem com os componentes do espectro de frequência abaixo de 0,0033 Hz, que seriam responsáveis pelo controle da frequência cardíaca durante as flutuações muito lentas, ligadas ao ritmo circadiano, durante os períodos de atividade e nas mudanças de postura (64). SDNNi se correlaciona com os componentes entre 0,0033 e 0,04 Hz do espectro de frequência e é menos afetado pela atividade e por mudanças de postura (63).

Do ponto de vista clínico, o estudo da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo obteve grande impulso a partir dos resultados obtidos por Kleiger et al. (68) e confirmados por vários outros autores (69, 70), demonstrando que pacientes pós-infarto do miocárdio com diminuição da variabilidade da frequência cardíaca apresentavam maior mortalidade. Um dos mecanismos propostos para o aumento da mortalidade nos pacientes com variabilidade diminuída é a diminuição do limiar para o desencadeamento de arritmias graves, secundária à redução do tono vagal (71).



Diversos métodos são usados para estratificar risco pós-infarto do miocárdio, como a quantificação da densidade de arritmias ventriculares no eletrocardiograma de 24 horas, a pesquisa de potenciais tardios no eletrocardiograma de alta resolução e a fração de ejeção ventricular. A variabilidade da frequência cardíaca, nesse contexto, é superior aos demais métodos, quando se trata de identificar risco de morte por evento arritmico. Ela apresenta valor preditivo independente, inclusive superior ao da fração de ejeção (72). Para estratificar mortalidade global, o desempenho da variabilidade da frequência cardíaca assemelha-se ao da fração de ejeção (73).

Além do infarto agudo do miocárdio, a variabilidade da frequência cardíaca já foi estudada em dezenas de situações clínicas que comprometem a modulação autonômica (74). Nos pacientes com insuficiência cardíaca, a variabilidade da frequência cardíaca também pode estar reduzida (75). Em grande parte, esta redução é consequência da ativação neuro-humoral, característica deste síndrome, com aumento da atividade simpática e diminuição da atividade vagal (76, 77). Além do comprometimento autonômico, a distensão do nó sinoatrial também contribui para a redução observada (78). Recentemente, Nolan et al. estudaram prospectivamente pacientes com diferentes graus de insuficiência cardíaca, através de índices no domínio do tempo. Os pacientes com redução de SDNN apresentaram maior taxa de mortalidade anual, quando comparados aos pacientes com variabilidade da frequência cardíaca normal (6). Nesse estudo, apesar dos pacientes com insuficiência cardíaca apresentarem redução dos índices de representação vagal (RMSSD e PNN50), estes índices não foram capazes de estratificar risco. Segundo os autores, o melhor desempenho de SDNN deve-se ao fato de ele ser afetado não só pelas anormalidades na modulação autonômica, mas também pelas alterações na atividade do sistema renina-

angiotensina, dos quimiorreceptores, por mudanças no padrão respiratório e pela inatividade física. Estes resultados reforçam a utilidade clínica da avaliação da variabilidade da frequência cardíaca na insuficiência cardíaca, mas revelam a dificuldade de interpretação dos diferentes métodos em relação aos possíveis mecanismos envolvidos.

No diabetes melito, o comprometimento autonômico é uma complicação freqüente, que acomete ambos os ramos do sistema nervoso autônomo (79), manifestando-se, entre outras formas, pela diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (80) e está associado com o aumento da mortalidade nesses pacientes (81, 82, 83), o que justifica os esforços para a sua detecção precoce. Tradicionalmente, o diagnóstico de neuropatia autonômica no diabetes melito é feito através dos testes autonômicos padronizados por Ewing et al. (54), mas os novos métodos computadorizados são cada vez mais empregados, tanto com análise de períodos longos (67, 84), como em períodos mais curtos de tempo (85, 86, 61, 87, 88, 89). Os índices no domínio do tempo de 24h, mais representativos da atividade vagal, como os componentes espectrais de baixa e alta frequência, estão diminuídos nos pacientes diabéticos portadores de neuropatia autonômica (55).

### **Avaliação dinâmica da atividade barorreflexa**

Habitualmente, a avaliação da atividade barorreflexa de seres humanos é realizada em laboratório, sob condições muito controladas, distintas daquelas encontradas na vida real. Com o advento de tecnologia que permite gravar a pressão arterial por períodos prolongados, foram desenvolvidos métodos no domínio do tempo e da frequência, com capacidade de avaliar a atividade barorreflexa durante as atividades habituais.

A análise no domínio do tempo utiliza os registros simultâneos da pressão arterial e da frequência cardíaca para identificar seqüências de três ou mais batimentos consecutivos, caracterizados por aumento progressivo da pressão arterial sistólica e aumento progressivo do intervalo de pulso, ou redução progressiva na pressão arterial sistólica e redução progressiva do intervalo de pulso. Da mesma forma que em laboratório, a atividade barorreflexa é expressa pela inclinação da regressão linear entre as mudanças na pressão arterial sistólica e na frequência cardíaca. Por esse tipo de abordagem, foi possível constatar que a atividade barorreflexa não se mantém estável durante as 24 horas do dia, diminuindo durante a vigília e aumentando durante os períodos de sono. Em indivíduos hipertensos (90), e em idosos (91) ocorre diminuição do número de seqüências de hipertensão/bradicardia e hipotensão/taquicardia, bem como menor inclinação da regressão linear. Em animais, a desnervação sinoaórtica praticamente elimina essas seqüências, indicando que a atividade barorreflexa é responsável por grande parte deste comportamento (92, 93). Informação similar pode ser obtida no domínio da frequência, através do cálculo do coeficiente de coerência ou da função de transferência entre a potência espectral da pressão arterial e da frequência cardíaca de períodos prolongados (94).

A análise dinâmica da atividade barorreflexa é um método complexo, que exige muito pós-processamento dos dados adquiridos e é afetado por perdas de estacionaridade. As informações obtidas referem-se somente à modulação da frequência cardíaca exercida pela pressão arterial, mas não permitem avaliar aspectos da modulação pressórica (94).

## **Métodos não-lineares**

Nos últimos anos, o crescente interesse pelo comportamento dos sistemas dinâmicos não-lineares, em diversas áreas da ciência, começou a influenciar também o estudo da regulação cardiovascular. A não-linearidade está presente em todos os sistemas vivos, produzindo comportamentos irregulares, que não são identificados corretamente pelas técnicas estatísticas convencionais. Com uma abordagem dinâmica não-linear, pode ser possível inferir sobre a estrutura do sistema, a partir do comportamento de apenas uma variável, desde que a série temporal seja medida com precisão suficiente, com frequência de amostragem adequada e por um período suficientemente longo (95). Diversas ferramentas específicas para o estudo dos sistemas dinâmicos não-lineares (96, 97) já foram utilizadas para estudar as oscilações do sistema cardiovascular. Tanto as oscilações da pressão arterial (98), como as da frequência cardíaca (99, 100), apresentam comportamento dinâmico não-linear, evidenciado, entre outras coisas, pela presença de caos determinístico (101), sugerindo que o uso de métodos lineares, como a análise espectral e os métodos no domínio do tempo, seja insuficiente para descrever a dinâmica do sistema cardiovascular (102, 103, 104). De uma forma geral, os métodos de análise não-linear podem quantificar determinadas características de um sistema, ou então, facilitar a visualização do seu comportamento. Dentre os métodos quantitativos, alguns têm sido utilizados com mais frequência no estudo do sistema cardiovascular, como a dimensão de correlação, que estima o grau de complexidade do sistema (95), a entropia aproximada, que refere-se à imprevisibilidade dos próximos eventos (97), o coeficiente de Lyapunov, que descreve o comportamento do grau de incerteza do sistema no tempo (96) e a análise do comportamento  $1/f$  da análise espectral

da frequência cardíaca, que refere-se ao comportamento assintótico da densidade da potência espectral em função da frequência (52), permitindo quantificar o componente fractal da série temporal (105, 106, 107, 108, 109). Apesar de serem métodos promissores para a avaliação do funcionamento cardiovascular, são considerados matematicamente complexos, dependem de rigorismo na aquisição dos dados e nem sempre são adaptáveis às condições da pesquisa biomédica (5). Dentre os métodos que facilitam a visualização da estrutura do sistema, os mais simples de serem aplicados são o mapa de retorno e o gráfico de fase. O mapa de retorno representa a relação de um determinado evento na série temporal representado no eixo do x, com o próximo evento, representado no eixo do y. Tratando-se de um sistema dinâmico complexo, esta forma de representação reduz a complexidade do comportamento do sistema, preservando as suas propriedades dinâmicas fundamentais mais estáveis (95). O gráfico de fase é uma variante do mapa de retorno, onde, no eixo do y, é representado não o próximo evento, mas a taxa de variação da variável no tempo. Este método representa o comportamento do sistema através de uma trajetória que retrata a evolução temporal do sistema (96).

O mapa de retorno, ao contrário do gráfico de fase, já foi utilizado para avaliar padrões de comportamento da variabilidade da frequência cardíaca em diferentes situações clínicas, como a insuficiência cardíaca (110, 111, 112, 113), o infarto do miocárdio (114, 115), arritmias cardíacas (116, 117) e durante o sono (118, 119, 120). Quando o mapa de retorno é empregado para avaliar séries temporais longas, como é o caso dos registros eletrocardiográficos de 24 horas, ocorre grande sobreposição de pontos, impedindo a visualização do comportamento do sistema no interior da distribuição. Outra limitação do método é o fato da análise ser frequentemente subjetiva, impedindo a quantificação dos

resultados.

Devido ao grande interesse existente em compreender o funcionamento do sistema cardiovascular e à necessidade de contornar as limitações dos métodos já existentes, optamos por desenvolver um novo método denominado mapa de retorno tridimensional. Este método é uma modificação do mapa de retorno clássico, construído para evitar sobreposição de pontos e permitir quantificação dos padrões de comportamento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Para estudar a frequência cardíaca, o mapa de retorno tridimensional foi construído como  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus densidade e para a pressão arterial como  $PA_n \times [(PA_{n+1})-(PA_n)] \times$  densidade.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS

1 - Testar a hipótese de que os índices do mapa de retorno tridimensional são sensíveis e específicos para detectar diferentes níveis de disfunção autonômica em pacientes portadores de diabetes melito.

2 - Testar a hipótese de que os índices do mapa de retorno tridimensional são reprodutíveis quando avaliam a variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos normais e em pacientes portadores de diabetes melito com diagnóstico de neuropatia autonômica.

3 - Testar a hipótese de que os índices do mapa de retorno tridimensional permitem identificar, de forma independente, a modulação do tônus simpático e parassimpático sobre o nó sinusal.

4 - Testar a hipótese de que o mapa de retorno tridimensional é capaz de detectar diferenças no comportamento da variabilidade das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, secundárias à eliminação dos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais.

5 - Testar a hipótese de que o mapa de retorno tridimensional é capaz de detectar diferenças entre a modulação da pressão arterial sistólica em relação à diastólica exercida pelos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais.

## CAPÍTULO III

### MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL: UMA NOVA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

#### INTRODUÇÃO

Inúmeros métodos têm sido propostos para estudar as oscilações da frequência cardíaca nos domínios do tempo e da frequência. A maioria desses métodos é capaz de detectar a modulação autonômica sobre o nó sinusal, mas pode não detectar adequadamente a modulação simpática (121). Recentemente, foi proposto o uso de mapas de retorno bidimensionais, também chamados por alguns de mapas de Poincarè, como uma forma alternativa de avaliar a variabilidade da frequência cardíaca. Eles são construídos plotando cada intervalo RR ( $RR_n$ ) versus o intervalo RR seguinte ( $RR_{n+1}$ ). Este método foi capaz de detectar diferentes padrões de variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca (110) e anormalidades na dinâmica da frequência cardíaca, antecedendo episódios de taquiarritmias ventriculares (117). Apesar dos mapas de retorno poderem apresentar a variabilidade da frequência cardíaca de uma forma elucidativa, ocorre sobreposição de pontos quando longos períodos de tempo são analisados, o que pode ocultar informações potencialmente importantes no interior da distribuição de pontos. Além disto, a maior parte das informações derivadas desta metodologia é qualitativa, baseada somente na morfologia geral da distribuição de pontos. Poucas tentativas foram feitas no sentido de criar índices objetivos de quantificação (117, 113, 122). Para superar essas limitações, desenvolvemos um mapa de retorno tridimensional onde plotamos  $RR_n$  versus



$[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus o número de contagens. Para quantificar de forma objetiva as imagens geradas por este método, foram desenvolvidos índices, que levam em consideração os aspectos morfológicos da distribuição resultante. Os objetivos deste estudo foram avaliar o desempenho dos índices derivados do mapa de retorno tridimensional no diagnóstico de neuropatia autonômica diabética e analisar as influências simpática e parassimpática sobre o mapa de retorno tridimensional, em um grupo de indivíduos saudáveis, utilizando bloqueio farmacológico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***ESTUDO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA DIABÉTICA***

Participaram do estudo 22 pacientes portadores de diabetes melito tipo 2, de acordo com os critérios do National Diabetes Data Group (123), que consultavam o ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A presença de neuropatia autonômica foi avaliada pelos testes cardiovasculares de avaliação autonômica descritos por Ewing et al. (54) e padronizados no Serviço Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (124): 1) resposta da frequência cardíaca à inspiração profunda (valor normal  $> 6$ ); 2) resposta da frequência cardíaca à manobra de Valsalva (normal  $> 1,2$ ); resposta da frequência cardíaca ao ortostatismo (normal 1,06); 4) resposta da pressão arterial ao ortostatismo (normal  $< 25$  mm Hg); e resposta da pressão arterial à preensão manual sustentada (normal  $> 10$  mm Hg). O diagnóstico de neuropatia autonômica foi estabelecido pela presença de mais de um teste autonômico cardiovascular alterado. Um grupo controle

foi composto por 12 voluntários assintomáticos, sem história de doença cardiovascular ou pulmonar, exame físico e eletrocardiograma de repouso normais. Tanto os pacientes como os indivíduos normais não estavam praticando atividade física regular e estavam todos em ritmo sinusal. Não foram incluídos no estudo fumantes, indivíduos com hipertensão arterial (pressão arterial sistólica  $> 139$  mm Hg, ou pressão arterial diastólica  $> 89$  mm Hg) e usuários regulares de álcool.

Em todos os indivíduos foi registrado o eletrocardiograma de 24 horas durante as atividades diárias normais, tendo sido evitado exercício físico ou uso de drogas que pudessem interferir com a função autonômica. O eletrocardiograma foi gravado continuamente por gravador CardioCorder modelo 459 (Del Mar Avionics, Irvine) e as fitas foram analisadas no analisador Del Mar 750A Innovator (Del Mar Avionics, Irvine) pela técnica semi-automática. Este analisador permite detectar os batimentos normais, os artefatos e as ectopias, criando uma série temporal de intervalos RR normais, com resolução de 2,4 milissegundos (125, 121). Para avaliar a reprodutibilidade do método os registros eletrocardiográficos foram repetidos em 2 dias consecutivos, em 9 pacientes com neuropatia autonômica e em 10 indivíduos normais.

### ***ESTUDO DE BLOQUEIO FARMACOLÓGICO***

Esse estudo foi conduzido em 6 indivíduos saudáveis, fisicamente ativos (idade média  $23 \pm [DP] 3$  anos, peso  $74 \pm 8$  kg e altura  $173 \pm 6$  cm), seguindo um protocolo que incorporou períodos de predominância vagal e simpática, em repouso e durante exercício. Os dados referentes aos índices da variabilidade da frequência cardíaca nos domínios do

tempo e da frequência usando este protocolo foram previamente relatados (121). Cada participante foi submetido a um teste de esforço em cicloergômetro, com cargas progressivas de trabalho, para determinar a capacidade máxima de exercício. Os indivíduos então retornaram ao laboratório em 4 dias não consecutivos, no mesmo horário, para realizar os estudos da variabilidade da frequência cardíaca. Em cada um dos dias os indivíduos foram submetidos a distintas intervenções farmacológicas por via intravenosa, cuja ordem de administração foi determinada de forma aleatória. Foram administrados placebo, propranolol, atropina e propranolol mais atropina. O propranolol foi administrado em dose única de 0,2 mg/kg. Após 35 minutos, foi administrada uma dose adicional de um terço da dose inicial, para assegurar  $\beta$ -bloqueio completo durante o protocolo de exercício (126). A atropina foi administrada na dose inicial de 0,04 mg/kg. Durante o protocolo, era administrada uma dose adicional de 4 mg, caso a frequência cardíaca diminuísse 10% em relação à frequência cardíaca máxima obtida durante o início da infusão (127). Para o duplo bloqueio autonômico, ambas as drogas foram administradas simultaneamente por injeção lenta. Após a infusão intravenosa, os indivíduos repousaram por 40 minutos em posição supina, em uma sala tranquila. Na seqüência, exercitaram-se por 20 minutos em cicloergômetro, na carga correspondente à 70 % da carga máxima de trabalho. Durante os 60 minutos do protocolo o eletrocardiograma foi continuamente gravado, usando o mesmo sistema de gravação e de análise descrito anteriormente. Ambos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e os indivíduos foram informados dos objetivos dos estudos, dos riscos, das possíveis complicações e dos desconfortos a que estariam sujeitos. Para participarem, os mesmos assinaram um termo de consentimento. Os termos de consentimento referentes aos dois

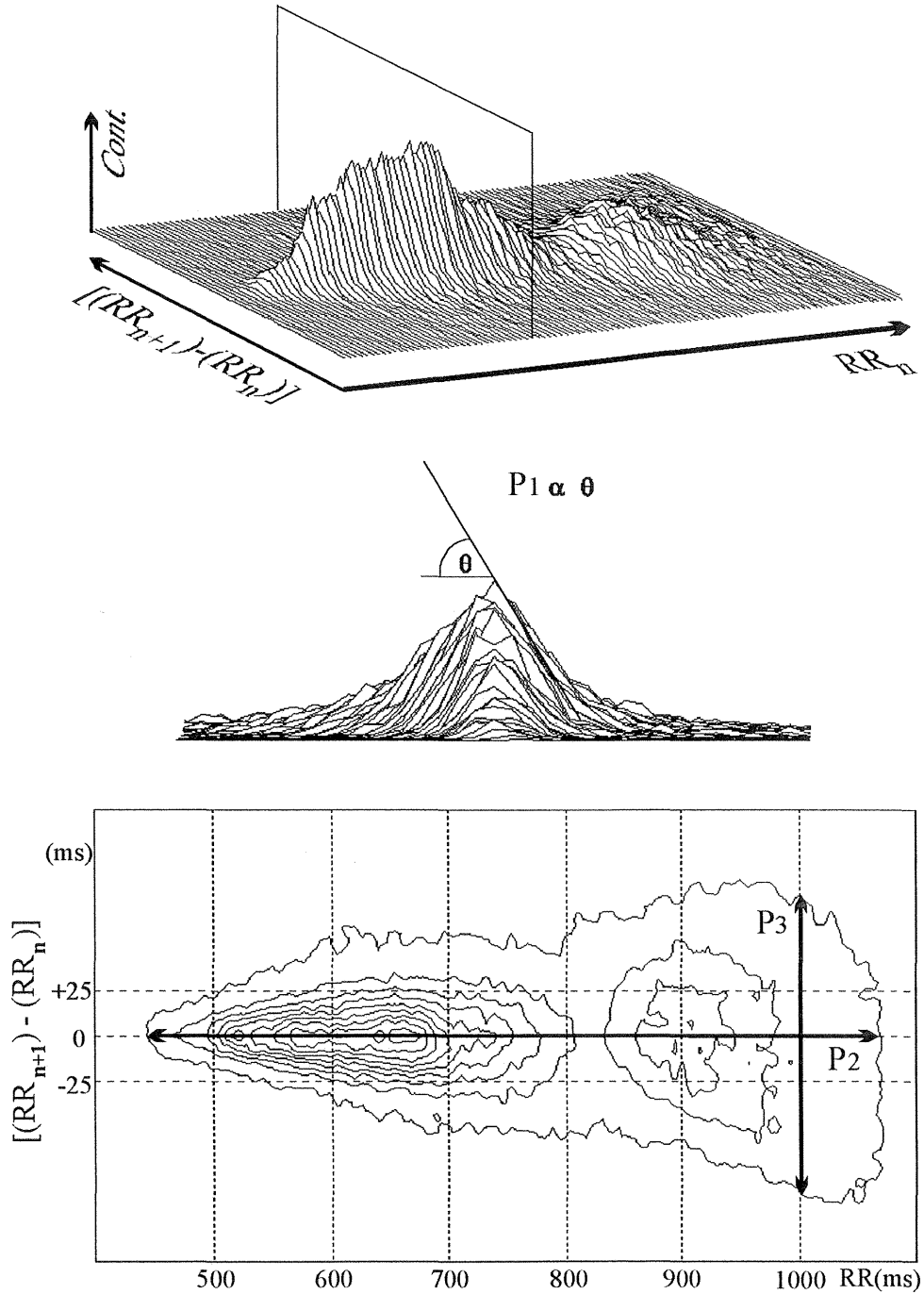
estudos deste capítulo estão descritos nos anexos 1 e 2 (Anexo).

### ***ÍNDICES DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO***

Os arquivos contendo os intervalos RR normais foram processados em um computador para calcular os seguintes índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, de acordo com recomendações internacionais (5): desvio padrão de todos os intervalos RR (SDNN); desvio padrão da média dos intervalos RR normais calculados em segmentos de 5 minutos (SDANNi); e raiz quadrada da média das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais (RMSSD).

### ***MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL***

Os mapas de retorno tridimensionais foram construídos plotando  $RR_n$  versus  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  versus o número de contagens. Todos os intervalos RR normais que ocorreram durante o período de tempo analisado são plotados no eixo do x, contra a diferença entre intervalos RR adjacentes, no eixo do y, com uma resolução de 7,2 milissegundos. Sempre que ocorreu sobreposição de pontos, o número de pontos sobrepostos foi expresso no eixo do z, normalizado pela densidade máxima de pontos. Foi desenvolvido um conjunto de índices para quantificar as imagens tridimensionais (Figura III – 1), denominados de  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e MN.  $P_1$  é inversamente proporcional à inclinação entre 10% e 90% da máxima densidade de pontos, calculada no plano que intercepta a distribuição na sua máxima concentração de pontos, perpendicular a  $RR_n$ .  $P_1$  foi expresso



$$MN = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$$

**Figura III – 1** – Definição dos índices do mapa de retorno tridimensional. Parte superior: distribuição em 3 dimensões de 24 h construída como  $RR_n \times [(RR_{n+1})-(RR_n)] \times$  contagens; o plano representado intercepta a distribuição na máxima densidade; Cont. representa o número de vezes cada evento é repetido, gerando sobreposição de pontos. Meio: visão da distribuição de 24 h ao longo do eixo  $RR_n$ ;  $P_1$  é inversamente proporcional à inclinação média da distribuição ( $\theta =$  inclinação média), calculada na máxima densidade, ao longo do plano descrito acima. Parte inferior: curvas de nível;  $P_2$  é a dispersão longitudinal máxima e  $P_3$  a dispersão transversal máxima. MN é o produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . ms = milissegundos.

como o produto de 100 menos o dobro da inclinação. Para calcular  $P_2$  e  $P_3$ , as imagens tridimensionais foram representadas em 10 curvas de nível igualmente espaçadas, entre a máxima concentração de pontos e a mínima densidade de 10 contagens, que define o contorno externo das curvas de nível.  $P_2$  é o máximo comprimento longitudinal e  $P_3$  a máxima largura transversal. MN é um índice geral calculado pelo produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . Para representar os índices do mapa de retorno tridimensional foi utilizada uma escala arbitrária.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados com distribuição normal foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e os dados sem distribuição normal foram expressos como média geométrica e intervalos de confiança de 95%. Para a comparação entre as condições de bloqueio farmacológico, foi usada análise de variância de uma via para medidas repetidas. Foi usado o teste exato de Fischer para comparar as características clínicas dos pacientes. As diferenças entre grupos foram avaliadas por análise de variância de uma via. Para comparações múltiplas foi utilizado o método de Student-Newman-Keuls. Considerando os testes autonômicos cardiovasculares como o padrão-ouro para a presença de neuropatia autonômica, foi calculada a acurácia total para os índices no domínio do tempo e para cada um dos índices derivados do mapa de retorno tridimensional, medindo-se a área sob a curva ROC (estatística “c”). Por não apresentarem distribuição normal, para serem analisados, os índices no domínio do tempo sofreram transformação logarítmica. A associação entre os índices no

domínio do tempo e os índices do mapa de retorno tridimensional foi avaliada usando o coeficiente de correlação de Pearson. Foi usada a correção de Bonferroni para avaliar a significância estatística das correlações, sendo considerada significativa uma probabilidade mínima de 0,001. Para estudar a reprodutibilidade dos índices da variabilidade da frequência cardíaca, foi calculado o coeficiente de correlação intraclasse. A significância estatística foi considerada para um valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### *ESTUDO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA DIABÉTICA*

As características dos pacientes diabéticos e controles estão descritas na Tabela III –

1. Os pacientes e os controles apresentaram idade, sexo e níveis de pressão arterial semelhantes. Os níveis de glicose de jejum e de frutossamina apresentados pelos pacientes diabéticos com neuropatia autonômica não foram significativamente diferentes dos pacientes diabéticos sem neuropatia autonômica.

**Tabela III - 1.** Características clínicas dos pacientes diabéticos e dos controles\*

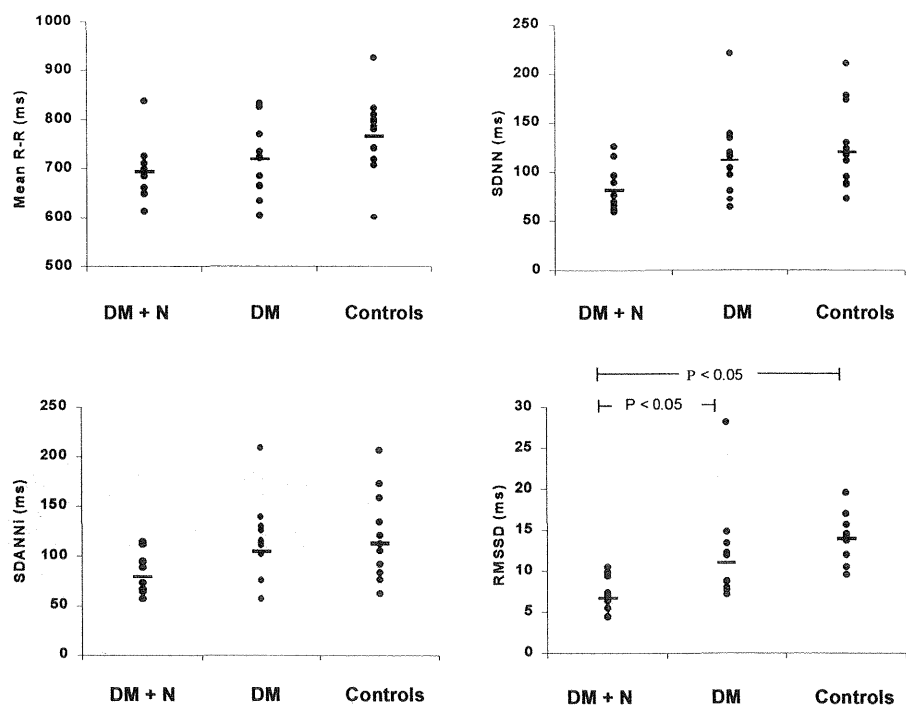
	Pacientes diabéticos		Controles n = 12
	Com neuropatia n = 10	Sem neuropatia n = 12	
Idade (anos)	62 ± 7	60 ± 8	60 ± 8
Sexo masculino	6 (67%)	5 (42%)	6 (50%)
Pressão arterial sistólica (mmHg)	132 ± 11	133 ± 11	124 ± 11
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77 ± 10	79 ± 8	76 ± 7
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 3	28 ± 3	26 ± 3
Glicemia de jejum (mg/dl)	216 ± 121	185 ± 63	-
Hemoglobina glicosilada (%)	8,8 ± 2	8,5 ± 2	-
Frutossamina (mmol/l)	4,1 ± 0,9	3,5 ± 0,3	-

\*Valores são média ± desvio-padrão ou número (porcentagem).

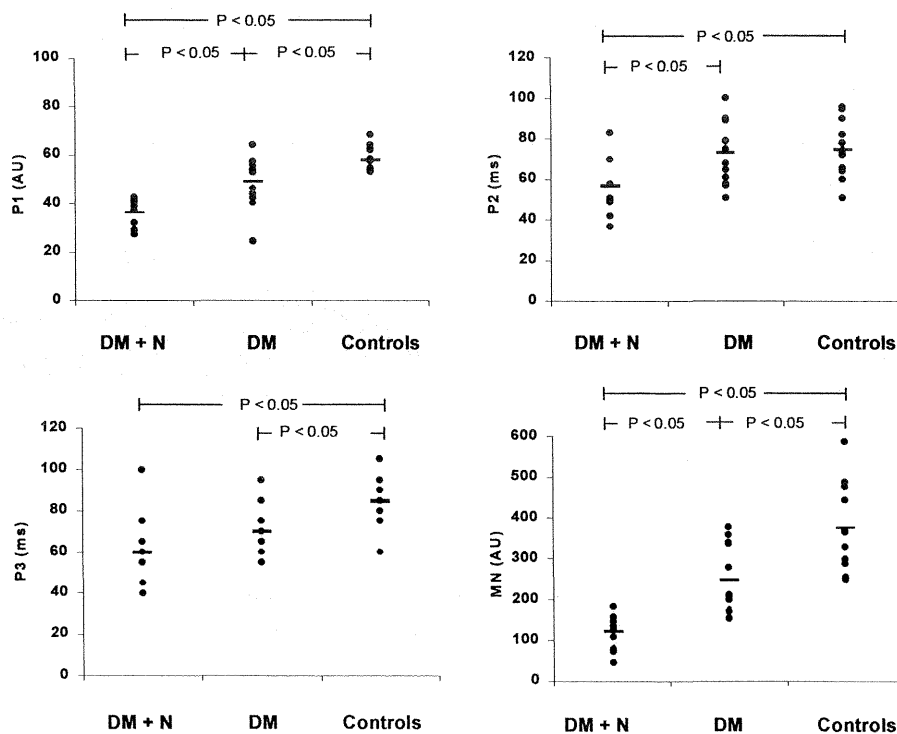
As Figuras III – 2 e III - 3 apresentam os resultados de 24 horas dos índices no domínio do tempo e dos índices do mapa de retorno tridimensional dos pacientes diabéticos e dos controles. Dos índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo que foram avaliados, apenas RMSSD detectou diferenças significativas entre os dois grupos de pacientes diabéticos. SDANNi e SDNN não foram capazes de detectar diferenças entre os grupos. Por outro lado, todos os quatro índices derivados do mapa de retorno tridimensional foram capazes de diferenciar pacientes com disfunção autonômica, daqueles com função autonômica preservada (Figura III – 3). Por exemplo,  $P_1$  e MN detectaram diferenças entre cada um dos 3 grupos estudados.  $P_2$  foi significativamente menor nos pacientes com neuropatia autonômica, comparado aos pacientes diabéticos sem neuropatia autonômica e os controles. Finalmente, os controles apresentaram valores significativamente maiores de  $P_3$ , quando comparados aos pacientes diabéticos com e sem neuropatia autonômica. Na Figura III – 4 estão apresentados exemplos representativos dos mapas de retorno tridimensionais de um indivíduo normal, de um paciente diabético sem neuropatia autonômica e de um paciente diabético com neuropatia autonômica.

Foi muito boa a acurácia total na detecção de disfunção autonômica, para todos os índices derivados do mapa de retorno tridimensional, calculada pela área sob a curva ROC (estatística “c”): 0,94, 0,82, 0,80 e 0,96 para  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e MN, respectivamente. A acurácia de  $P_1$  e de MN foi significativamente melhor do que a dos índices no domínio do tempo. RMSSD apresentou uma área sob a curva ROC (0,90) similar a  $P_2$  e a  $P_3$ , enquanto SDNN apresentou uma área sob a curva (0,78) similar a  $P_2$ . SDANNi apresentou uma área sob a curva (0,76) significativamente menor quando comparada a todos os índices derivados do mapa de retorno tridimensional.

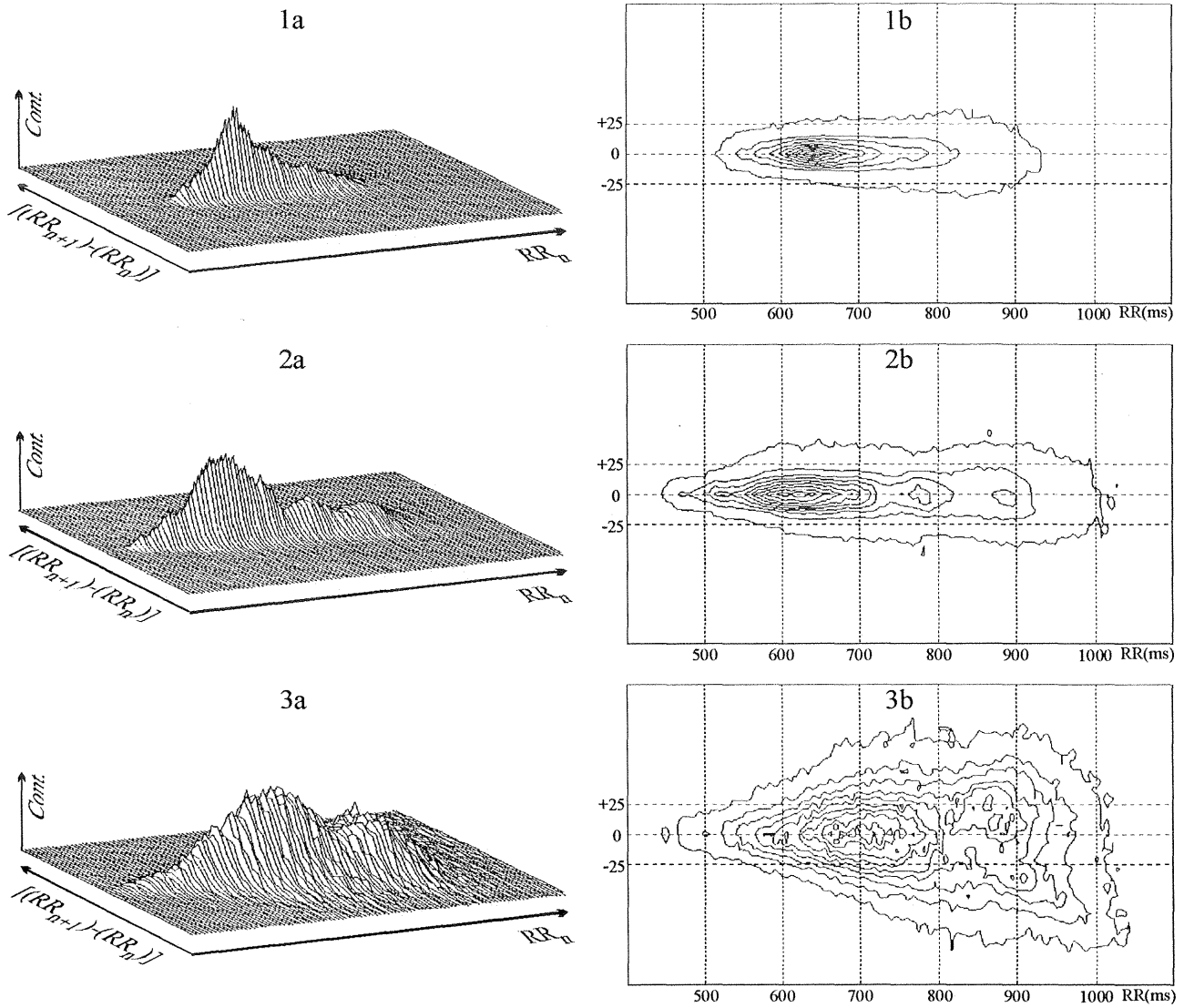




**Figura III – 2 -** Dados individuais (●) e médias (-) para os índices no domínio do tempo em pacientes com diabetes melito com neuropatia autonômica (DM + N), pacientes com diabetes melito sem neuropatia autonômica (DM) e controles (Controls). Mean R-R: média de todos os intervalos RR normais em 24 horas. Demais abreviaturas definidas no texto.



**Figura III – 3 -** Dados individuais (●) e médias (-) para os índices derivados do mapa de retorno tridimensional em pacientes com diabetes melito com neuropatia autonômica (DM + N), pacientes com diabetes melito sem neuropatia autonômica (DM) e controles (Controls).



**Figura III – 4** – Exemplos representativos do mapa de retorno tridimensional de 24 h em um paciente diabético com neuropatia autônoma (1); um paciente diabético sem neuropatia autônoma (2); e um indivíduo normal (3). Apresentação em 3 dimensões (a) e em curvas de nível (b).

Na Tabela III – 2 estão apresentados os coeficientes de correlação entre os índices no domínio do tempo e os índices derivados do mapa de retorno tridimensional, considerando todos os pacientes diabéticos e os controles. Não foi encontrada nenhuma correlação entre  $P_1$  e os índices no domínio do tempo.  $P_2$  correlacionou-se significativamente com todos os índices no domínio do tempo.  $P_3$  e MN correlacionaram-se com RMSSD (todos  $p < 0,01$ ).

### **REPRODUTIBILIDADE**

Para os 19 indivíduos nos quais o eletrocardiograma foi gravado por dois dias consecutivos, os índices derivados do mapa de retorno tridimensional no primeiro dia apresentaram os seguintes coeficientes de correlação intraclasse, em relação aos obtidos no segundo dia:  $P_1 - 0,81$ ;  $P_2 - 0,78$ ;  $P_3 - 0,69$  e MN  $- 0,82$  (todos  $p < 0,01$ ). Resultados similares foram observados para os índices no domínio do tempo: SDNN  $- 0,90$ ; SDANNi  $- 0,90$ ; e RMSSD  $- 0,81$  (todos  $p < 0,01$ ).

**Tabela III - 2.** Coeficientes de correlação (Pearson) entre os índices no domínio do tempo e os índices derivados do mapa de retorno tridimensional. Índices no domínio do tempo foram transformados logaritmicamente.

	P1	P2	P3	MN
Log SDANNi	0,18	0,90*	0,39	0,38
Log SDNN	0,23	0,94*	0,48	0,47
Log RMSSD	0,52	0,76*	0,71*	0,77*

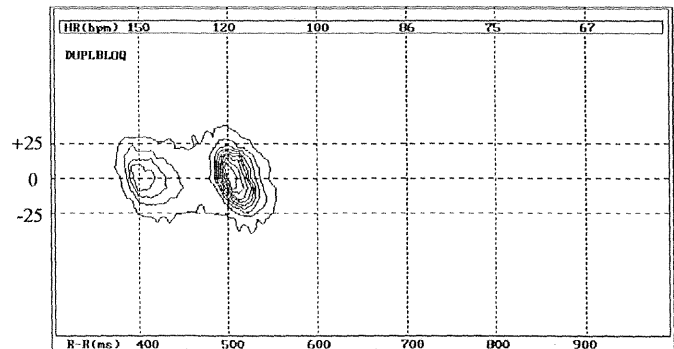
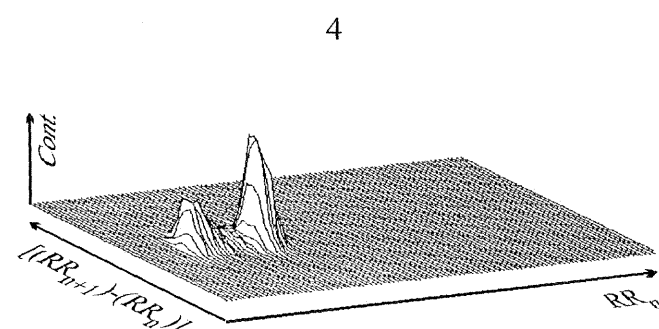
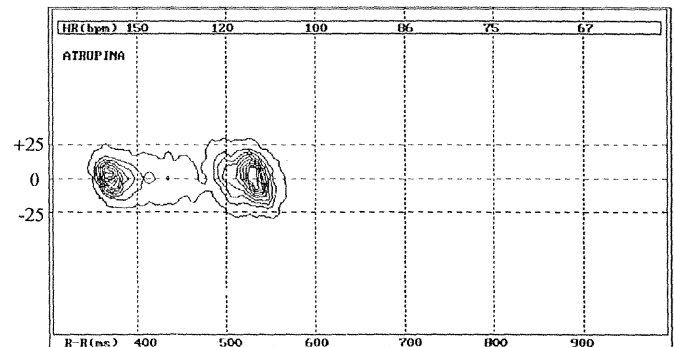
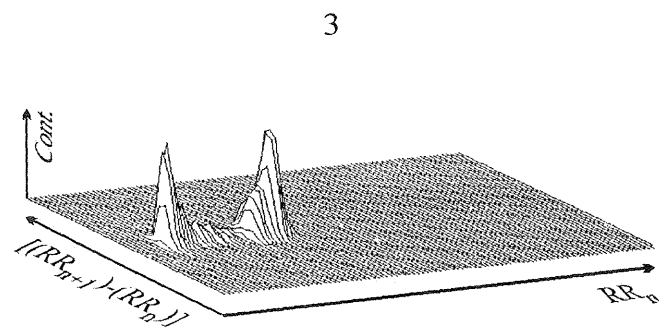
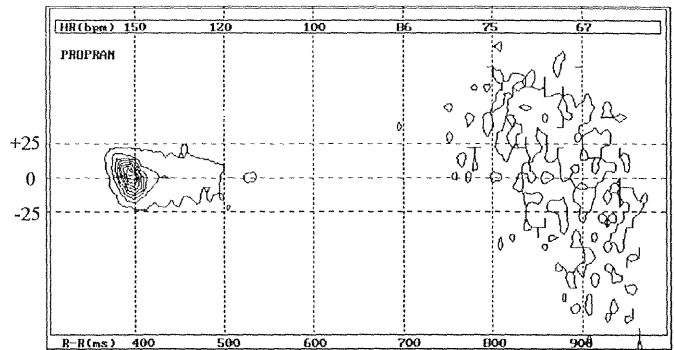
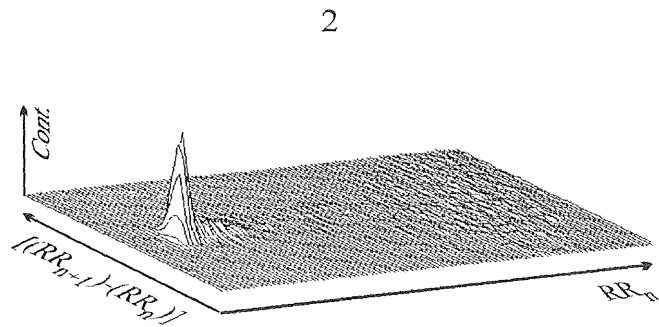
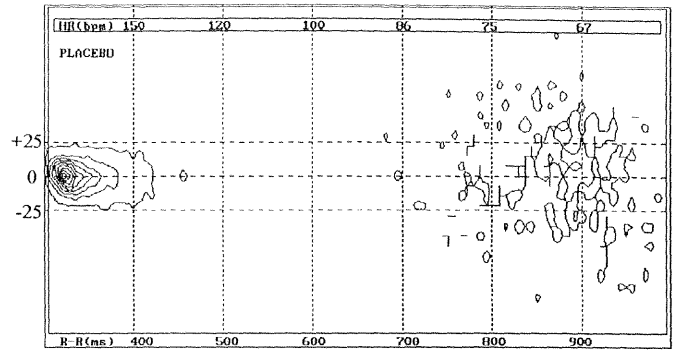
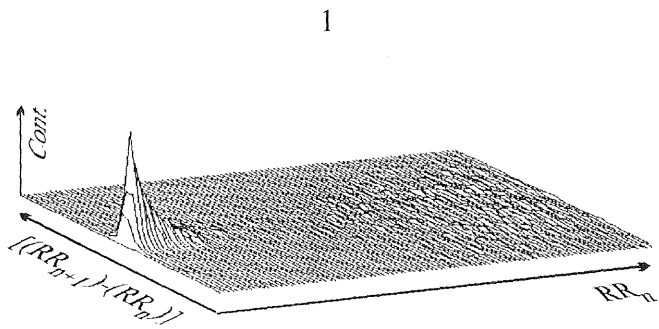
\*  $p < 0,001$

## ***ESTUDO COM BLOQUEIO FARMACOLÓGICO***

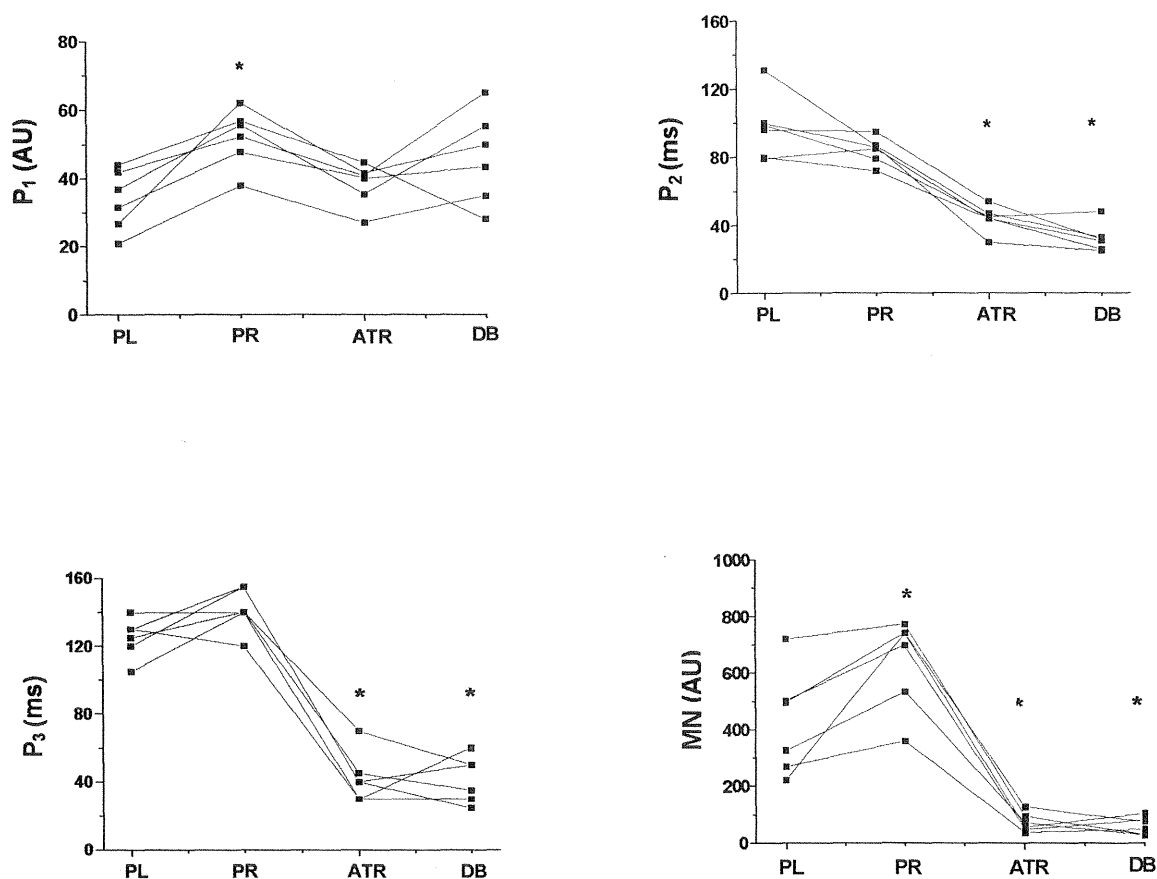
A Figura III - 5 apresenta exemplos representativos do mapa de retorno tridimensional de um mesmo indivíduo submetido a cada uma das 4 intervenções (placebo, propranolol, atropina, duplo-bloqueio). A Figura III - 6 apresenta os resultados dos efeitos do bloqueio farmacológico com propranolol e atropina. Durante o bloqueio simpático com propranolol, houve aumento significativo em  $P_1$  e MN, quando comparado com placebo. Não houve diferenças em  $P_2$  e  $P_3$  com o bloqueio simpático. Com exceção de  $P_1$ , os demais índices derivados do mapa de retorno tridimensional diminuíram com o bloqueio parassimpático e efeitos semelhantes foram observados após duplo bloqueio (Figura III - 6). Os efeitos do bloqueio farmacológico em índices no domínio do tempo foram apresentados previamente (121). Salientamos que nenhum dos índices no domínio do tempo foram modificados significativamente durante o bloqueio simpático com propranolol, mas sofreram clara influência do bloqueio parassimpático.

## **DISCUSSÃO**

Neste estudo, foi demonstrado que o mapa de retorno tridimensional é um método que apresenta acurácia para avaliar o sistema nervoso autônomo. Este método foi capaz de detectar a modulação parassimpática e simpática sobre o nó sinusal, identificou pacientes diabéticos com neuropatia autonômica, correlacionou-se com os índices comprovadamente de representação vagal e apresentou reprodutibilidade apropriada. Ele é uma modificação do mapa de retorno clássico (110), desenvolvido para evitar sobreposição de pontos e permitir uma adequada quantificação da variabilidade da frequência cardíaca. Apesar dos mapas de



**Figura III – 5** – Mapa de retorno tridimensional de 60 min (40 min de repouso + 20 min de exercício): 1) sob efeito de placebo; 2) propranolol; 3) atropina; 4) duplo-bloqueio. Apresentação em 3 dimensões à esquerda e em curvas de nível à direita. HR = frequência cardíaca; bpm = batimentos pôr minuto; R-R = intervalos RR; ms = milissegundos.



**Figura III - 6** - Dados individuais dos índices derivados do mapa de retorno tridimensional em 6 indivíduos após a administração de placebo (PL), propranolol (PR), atropina (ATR), e duplo bloqueio (DB) com propranolol e atropina. AU = unidades arbitrárias; \* = estatisticamente diferente de placebo (ANOVA para medidas repetidas e Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas).

retorno bidimensionais já terem sido capazes de diferenciar distintos padrões de variabilidade da frequência cardíaca, a análise não é feita através de índices objetivos e, devido à forma como eles são construídos, podem ocultar informações potencialmente relevantes. Baseados nisso, na construção do mapa de retorno tridimensional, modificamos o mapa de retorno bidimensional em dois aspectos. Primeiro, cada intervalo RR não foi plotado contra o próximo intervalo RR mas contra a diferença entre intervalos RR sucessivos  $[RR_n \times (RR_{n+1}) - (RR_n)]$ . Segundo, a sobreposição de pontos foi plotada na terceira dimensão, como o eixo z. Finalmente, a distribuição de pontos pode ser quantificada por 3 índices específicos e um índice geral.

#### ***MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL VERSUS BIDIMENSIONAL***

Os mapas de retorno bidimensionais foram usados com sucesso para descrever padrões de comportamento das oscilações dos intervalos RR (110). Algumas tentativas já foram feitas no sentido de quantificar a variabilidade da frequência cardíaca expressa por esse método, medindo os eixos longitudinal e transversal da distribuição de pontos. Alguns autores fizeram medidas manuais, após imprimir os mapas de retorno em papel (113), o que pode prejudicar os resultados, dando margem para uma maior variabilidade interobservadores. Outros determinaram a borda externa da distribuição de pontos ajustando uma elipse, cujo centro coincidia com o ponto central da distribuição (117). Considerando que os componentes não lineares da variabilidade da frequência cardíaca podem gerar distribuições assimétricas (104), muitos pontos podem ser excluídos por esta abordagem, especialmente na região de frequências cardíacas mais baixas, reduzindo as medidas

dependentes da variabilidade batimento a batimento. Em nosso estudo, o contorno externo das curvas de nível do mapa de retorno tridimensional foi estabelecido automaticamente, a partir do número mínimo de 10 contagens. Eventos que ocorreram menos do que 10 vezes durante o período de análise foram excluídos. Com esta abordagem, mesmo que a distribuição apresentasse marcada assimetria, porém de forma consistente, o contorno assimétrico não era excluído da análise.

Quando os mapas de retorno são construídos utilizando-se  $RR_n$  versus  $Rr_{n+1}$ , a largura da distribuição pode subestimar a variabilidade batimento a batimento, porque as contribuições geradas pelos aumentos e diminuições da frequência cardíaca não são ortogonais ao eixo principal da distribuição. Esta subestimação pode ser evitada utilizando a primeira derivada do intervalo RR  $[(RR_{n+1})-(RR_n)]$  como um dos eixos. Portanto  $P_3$ , a máxima largura da distribuição, parece representar melhor a verdadeira variabilidade batimento a batimento máxima, especialmente na presença de dispersão e assimetria pronunciadas. Finalmente, os mapas de retorno bidimensionais, construídos a partir de períodos longos de tempo, resultam em sobreposição excessiva de pontos no interior da distribuição, ocultando informação referente à densidade de ocupação. Com a abordagem tridimensional, é possível conhecer a concentração de pontos dentro da distribuição, permitindo avaliar a importância relativa de cada um dos aspectos morfológicos gerados pelo mapa de retorno.

### ***DETECÇÃO DA MODULAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA SOBRE O NÓ SINUSAL***

Os índices da variabilidade da frequência cardíaca já foram amplamente utilizados



para detectar a modulação parassimpática sobre o nó sinusal, mas estes índices podem não detectar corretamente a modulação simpática (121, 128). Já foram feitas algumas tentativas para estudar a modulação autonômica da frequência cardíaca a partir de mapas de retorno. Tulppo et al. (129) avaliaram, em repouso e durante cargas progressivas de exercício, o efeito do bloqueio parassimpático com atropina sobre a variabilidade da frequência cardíaca, utilizando o mapa de retorno bidimensional. A variabilidade da frequência cardíaca expressa pelo mapa de retorno foi quantificada pelo cálculo do desvio padrão dos pontos sobre os eixos longitudinal e transversal da distribuição de pontos, os quais correspondiam aos eixos de uma elipse previamente ajustada à distribuição de pontos. Com essa abordagem, os autores puderam identificar a modulação parassimpática, mas o estudo não incluiu bloqueio simpático. Outros estudos analisaram o efeito do betabloqueio sobre mapas de retorno bidimensionais de 24 horas. Keeley et al. (114) não encontraram diferenças nos mapas após a administração de metoprolol. Outros investigadores encontraram apenas um aumento no máximo eixo transversal após o betabloqueio (113, 130), que corresponde à região de frequências cardíacas mais baixas, modulada pelo vago (118). Este comportamento sugere que o mapa de retorno bidimensional provavelmente detectou o aumento na modulação vagal, resultante da redução na atividade simpática obtida pelo betabloqueio, mas não necessariamente a modulação simpática em si. Na verdade, espera-se que a modulação simpática deva manifestar-se na outra extremidade da distribuição, que corresponde à região de frequências cardíacas mais rápidas.

No presente estudo, o protocolo utilizado foi elaborado para incluir, de forma inequívoca, tanto períodos de predominância vagal como simpática (131), longos o bastante para permitir a construção do mapa de retorno tridimensional, mas com uma duração segura

de 60 minutos, para viabilizar o emprego de bloqueio autonômico farmacológico. Com esse protocolo, observamos que o índice  $P_2$ , que representa o maior eixo longitudinal, e o índice  $P_3$ , que representa o maior eixo transversal, estavam reduzidos durante a administração de atropina e durante o duplo-bloqueio, mas não foram afetados pela infusão isolada de propranolol. Isto sugere que  $P_2$  e  $P_3$  representam a modulação vagal sobre o nó sinusal. Além disso, o índice  $P_1$ , que sempre é medido durante as frequências cardíacas mais altas, correspondendo ao período de exercício, aumentou significativamente durante a administração de propranolol, indicando sua capacidade em detectar a modulação simpática. Finalmente, o índice MN, composto pelo produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ , aumentou com a infusão de propranolol, e diminuiu com a infusão de atropina e propranolol mais atropina, sugerindo que talvez possa refletir tanto a modulação simpática, como parassimpática, sobre o nó sinusal.

### ***CORRELAÇÃO COM OS ÍNDICES NO DOMÍNIO DO TEMPO***

Os índices derivados do mapa de retorno tridimensional representam a variabilidade da frequência cardíaca em 3 aspectos: grau de concentração de pontos durante as frequências cardíacas mais altas ( $P_1$ ), faixa dinâmica de modulação da frequência cardíaca ( $P_2$ ), e variabilidade batimento a batimento durante as frequências cardíacas mais baixas ( $P_3$ ). Como a atividade simpática predomina durante as frequências cardíacas mais altas (118), o índice  $P_1$  parece ser influenciado pelo sistema nervoso simpático.  $P_1$  não correlacionou-se com nenhum índice no domínio do tempo, possivelmente porque nenhum deles é significativamente influenciado pela modulação simpática. O índice  $P_2$  é influenciado por

perdas de estacionaridade da série temporal, representando a capacidade de resposta do nó sinusal a vários estímulos, aumentando e reduzindo a frequência cardíaca em resposta à modulação simpática e vagal. Este índice correlacionou-se fortemente com os índices de longo prazo SDANNi e SDNN. O índice  $P_3$  representa a diferença máxima entre intervalos RR adjacentes e correlacionou-se com o índice de curto prazo RMSSD, que é considerado um índice puramente vagal. Nossos achados para  $P_2$  e  $P_3$  estão de acordo com outros estudos que correlacionaram os eixos longitudinal e transversal do mapa de retorno bidimensional respectivamente com índices no domínio do tempo de longo e curto prazo (114, 115). O índice MN parece ser fortemente influenciado pela atividade parassimpática, correlacionando-se somente com RMSSD.

### ***DETECÇÃO DE NEUROPATIA AUTONÔMICA EM PACIENTES DIABÉTICOS***

Apesar de diversos testes terem sido padronizados para avaliar a presença de neuropatia autonômica cardiovascular, ainda não há um consenso sobre qual teste é o mais apropriado (132). Neste estudo, foram escolhidos como padrão-ouro um conjunto de 5 testes de função autonômica, por apresentarem sensibilidade e especificidade apropriadas, de acordo com as recomendações da American Diabetes Association e da American Academy of Neurology (55). Dos índices no domínio do tempo estudados, apenas RMSSD, considerado puramente vagal (5), foi capaz de detectar pacientes com neuropatia autonômica comprovada, mas não diferenciou os pacientes diabéticos sem neuropatia autonômica dos controles. Os outros dois índices de longo prazo, SDNN e SDANNi, não foram significativamente diferentes nos 3 grupos estudados. Em outros estudos (84, 133), os

índices no domínio do tempo foram utilizados com sucesso, para detectar disfunção autonômica em pacientes diabéticos. Essa discrepância em relação aos resultados deste estudo pode ser explicada, em parte, pela idade mais avançada na nossa amostra. Como a variabilidade da frequência cardíaca diminui com a idade (134), o efeito da disfunção autonômica sobre esses índices pode ter sido menos evidente.

Em relação à abordagem não-linear utilizada neste estudo, todos os índices derivados do mapa de retorno tridimensional foram capazes de diferenciar os pacientes diabéticos com neuropatia autonômica dos controles.  $P_1$  e MN também detectaram diferentes graus de disfunção autonômica, separando os pacientes diabéticos com neuropatia autonômica dos sem neuropatia autonômica, sugerindo que esses novos índices podem ser mais sensíveis na detecção de disfunção autonômica do que os índices no domínio do tempo. Isto talvez possa ser explicado pela capacidade de  $P_1$  em detectar a modulação simpática sobre o nó sinusal. Usando uma abordagem diferente, Hnatkova et al. (122) também calcularam uma função de densidade na máxima concentração de pontos em um mapa de retorno bidimensional clássico. A informação referente à densidade da distribuição foi mais sensível do que os índices no domínio do tempo para identificar pacientes pós-infarto do miocárdio com risco de desenvolver eventos arrítmicos.

Portanto, nossos dados indicam que os índices derivados do mapa de retorno tridimensional são reprodutíveis, quantificam a modulação, tanto parassimpática como simpática, sobre o nó sinusal e identificam disfunção autonômica em pacientes diabéticos.

## CAPÍTULO IV

### *IMPACTO DA DESNERVAÇÃO SINOÁORTICA SOBRE A VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL AVALIADA PELO MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL*

#### INTRODUÇÃO

O estudo das oscilações da pressão arterial batimento a batimento, através de métodos nos domínios do tempo e da frequência, tem permitido vislumbrar parte dos processos modulatórios responsáveis pela homeostase pressórica (1). Estudos em animais, utilizando desnervação sinoaórtica, apontam a atividade barorreflexa como sendo a responsável por diversos aspectos da regulação da pressão arterial (38). Contudo, devido à natureza complexa do controle cardiovascular, envolvendo receptores periféricos, centros integrativos no sistema nervoso central e efetores autonômicos, ainda é escasso o conhecimento sobre a regulação instantânea da pressão arterial. Recentemente, a análise do comportamento das oscilações da pressão arterial, através de métodos empregados no estudo do comportamento dinâmico não-linear, revelou aspectos da regulação cardiovascular inacessíveis pelos métodos tradicionais (135). Entre os métodos de abordagem não-linear de séries temporais em modelos biológicos, o mapa de retorno é um método de fácil execução, que representa a relação de um determinado evento com o próximo, permitindo com isso visualizar, de forma qualitativa, as propriedades dinâmicas fundamentais do sistema (95). Habitualmente ele é construído representando o primeiro evento da série temporal no eixo do x e o próximo evento no eixo do y, e assim

sucessivamente, por toda a série temporal. Recentemente, utilizamos um mapa de retorno tridimensional, para estudar o comportamento da pressão arterial (PA) batimento a batimento, construído como  $PA_n \times [(PA_{n+1})-(PA_n)] \times \text{densidade}$  (136). Para avaliar o comportamento da pressão arterial de forma quantitativa, são utilizados índices de quantificação baseados nos aspectos morfológicos da distribuição resultante. Neste estudo, avaliamos o papel da atividade barorreflexa sobre o comportamento das oscilações das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, através do mapa de retorno tridimensional, em ratos íntegros e ratos submetidos à desnervação sinoaórtica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram estudados 10 ratos Wistar, machos, pesando entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências-UFRGS, os quais foram alimentados “ad libidum”, com livre acesso à água. A temperatura era mantida em torno de 20 a 25° e o ciclo claro-escuro por 12 horas. Cinco ratos foram submetidos à desnervação sinoaórtica e o restante foi mantido íntegro. Em todos os animais foi obtido o registro direto da pressão arterial por 30 minutos. Nos ratos submetidos à desnervação sinoaórtica, o registro da pressão arterial foi feito 20 dias após o procedimento.

### ***CATETERIZAÇÃO DE VASOS***

Para a obtenção do registro da pressão arterial, a artéria femoral foi canulada no dia

anterior. O procedimento baseou-se na descrição de Waynforth et al. (137). Os animais foram anestesiados com éter etílico. Foram inseridos catéteres confeccionados com tubos de Tygon PE-50, de aproximadamente 12 cm, conectados a tubos de polietileno PE-10, de aproximadamente 5 cm (Clay Adams, USA) na aorta abdominal, através de acesso pela artéria femoral. Os catéteres foram exteriorizados no dorso do animal. Para evitar obstruções, ao final do procedimento as cânulas eram preenchidas com heparina sódica (Liquemine - Roche, 5000 UI), diluída em solução fisiológica de cloreto de sódio 0.9%, na proporção de 1 para 100.

### ***REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL***

Foram realizados registros de pressão arterial pela manhã ou à tarde, por cerca de 30 minutos, com os animais acordados. Antes do registro de pressão, cada animal permanecia próximo ao local de registro, em sua caixa sem a respectiva tampa, coberto com uma compressa limpa, por um período de tempo suficiente para uma adequada ambientação. Após conexão da cânula arterial a uma extensão, a qual estava conectada ao transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, USA), iniciava-se o registro de pressão batimento-a-batimento. O transdutor de pressão era acoplado a um condicionador de sinais Hewlett Packard (HP 8805C), o qual era ligado por um seletor de canais à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS-DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA) em computador modelo PC 486 (66 Mhz e 8 Mb RAM). A frequência de amostragem utilizada foi de 1 KHz. O programa utilizado (CODAS) permitiu trabalhar diretamente com a onda de pulso. Os dados obtidos foram gravados em disco rígido. O mesmo programa permitiu

calcular, para cada onda de pulso, valores de pico (sístole), vale (diástole) e o período de tempo entre um pico e outro, os quais geraram uma planilha que foi analisada em programa Excel 5.0 para Windows. Desta análise, obteve-se valores das pressões arteriais sistólica, diastólica e média e foi calculado o desvio padrão. A frequência cardíaca foi calculada a partir dos períodos de tempo transcorridos entre os picos de pressão.

### ***DESNERVAÇÃO SINOÁORTICA***

A desnervação sinoaórtica foi realizada de acordo com o método descrito por Krieger (13). Este consiste em uma incisão mediana na região cervical anterior, separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vaso nervoso, constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático. As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado são seccionadas. O outro contingente de fibras aórticas, que pode situar-se junto ao nervo laringeo inferior, é interrompido quando secciona-se o laringeo superior, ou então como fibras isoladas junto ao laringeo inferior. Em um plano superior, a bifurcação da carótida comum é localizada, exposta e dissecada completamente nos dois lados. São seccionadas as fibras carotídeas e destruído o corpúsculo carotídeo. Logo após, o nervo laringeo superior é seccionado bilateralmente.

Para confirmar o sucesso da desnervação sinoaórtica, foi testada a integridade dos pressorreceptores (138), através da observação da resposta da frequência cardíaca a uma infusão de fenilefrina suficiente para elevar a pressão arterial média em 40 mmHg. Foram considerados desnervados os ratos que apresentaram diminuição da frequência cardíaca



inferior a 20 batimentos (14, 28, 139 ).

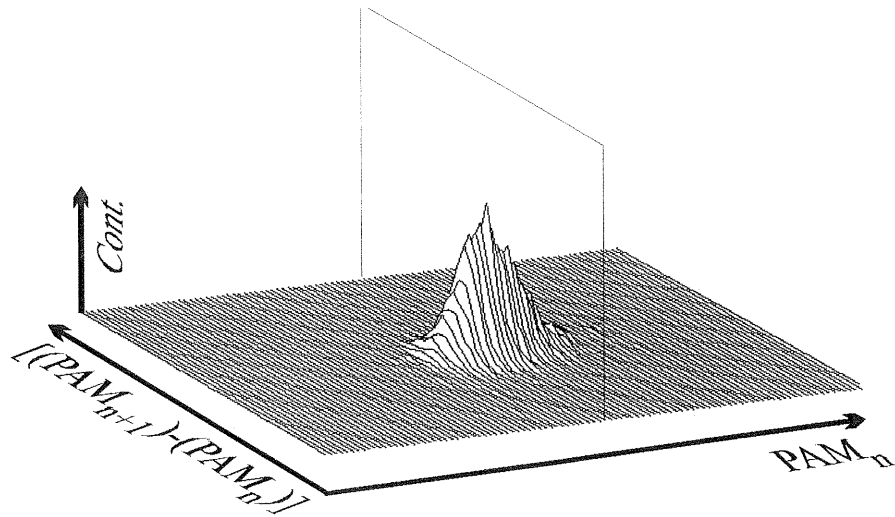
Os estudos em ratos foram conduzidos de acordo com as normas vigentes no país, seguindo os conceitos de ética e bem-estar sugeridos pela comunidade científica internacional (140).

### ***MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL***

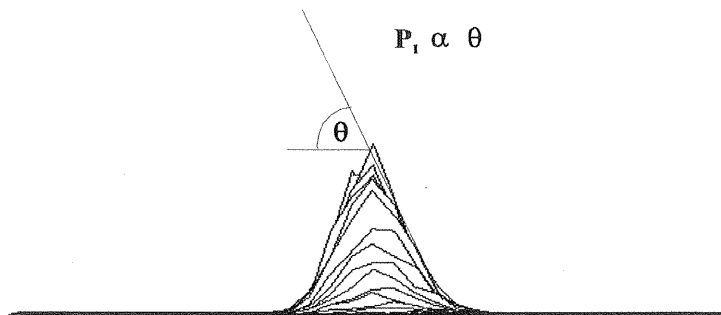
O mapa de retorno tridimensional de pressão arterial foi construído conforme descrito no Capítulo III, apenas substituindo os intervalos RR por valores de pressão arterial ( sistólica, diastólica e média ), ou seja,  $PA_n \times [(PA_{n+1})-(PA_n)] \times \text{densidade}$  (Figura IV - 1). A delimitação do contorno externo das curvas de nível foi semelhante ao empregado no estudo com bloqueio farmacológico, que é baseado na ocorrência de no mínimo 3 contagens. Nenhuma modificação foi feita no cálculo dos índices de quantificação (Figura IV-1).

### ***GRÁFICOS DE FASE***

Para auxiliar na interpretação do comportamento da pressão arterial, revelado pelas imagens do mapa de retorno tridimensional, foram construídos gráficos de fase das séries temporais de pressão arterial média. Foram construídos, para cada rato, gráficos de fase seqüenciais, contendo 700 eventos cada um, e um gráfico de fase único, contendo 11000 eventos. Esse último, englobando praticamente todo o período de análise. No eixo do x, foram representados os valores de pressão arterial e, no eixo do y, a taxa de variação desta



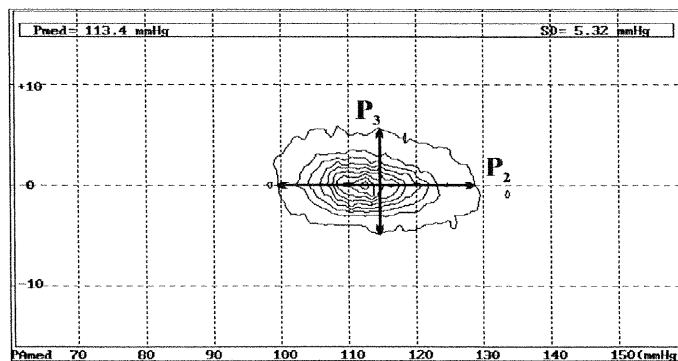
$$MN = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$$



$P_1 \propto$  declividade na máxima concentração

$P_2$  dispersão longitudinal máxima

$P_3$  dispersão transversal máxima



**Figura IV – 1** – Definição dos índices do mapa de retorno tridimensional. Parte superior: distribuição em 3 dimensões de 30 minutos construída como  $PAM_n \times [(PAM_{n+1})-(PAM_n)] \times$  contagens; o plano representado intercepta a distribuição na máxima densidade; PAM representa a pressão arterial média; Cont. representa o número de vezes cada evento é repetido, gerando sobreposição de pontos. Meio: visão da distribuição de 30 minutos ao longo do eixo  $PAM_n$ ;  $P_1$  é inversamente proporcional à inclinação média da distribuição ( $\theta =$  inclinação média), calculada na máxima densidade, ao longo do plano descrito acima. Parte inferior: curvas de nível;  $P_2$  é a dispersão longitudinal máxima e  $P_3$  a dispersão transversal máxima. MN é o produto de  $P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot 10^{-3}$ . mmHg = milímetros de mercúrio. Pmed = média da pressão arterial média. SD = desvio-padrão da pressão arterial média.

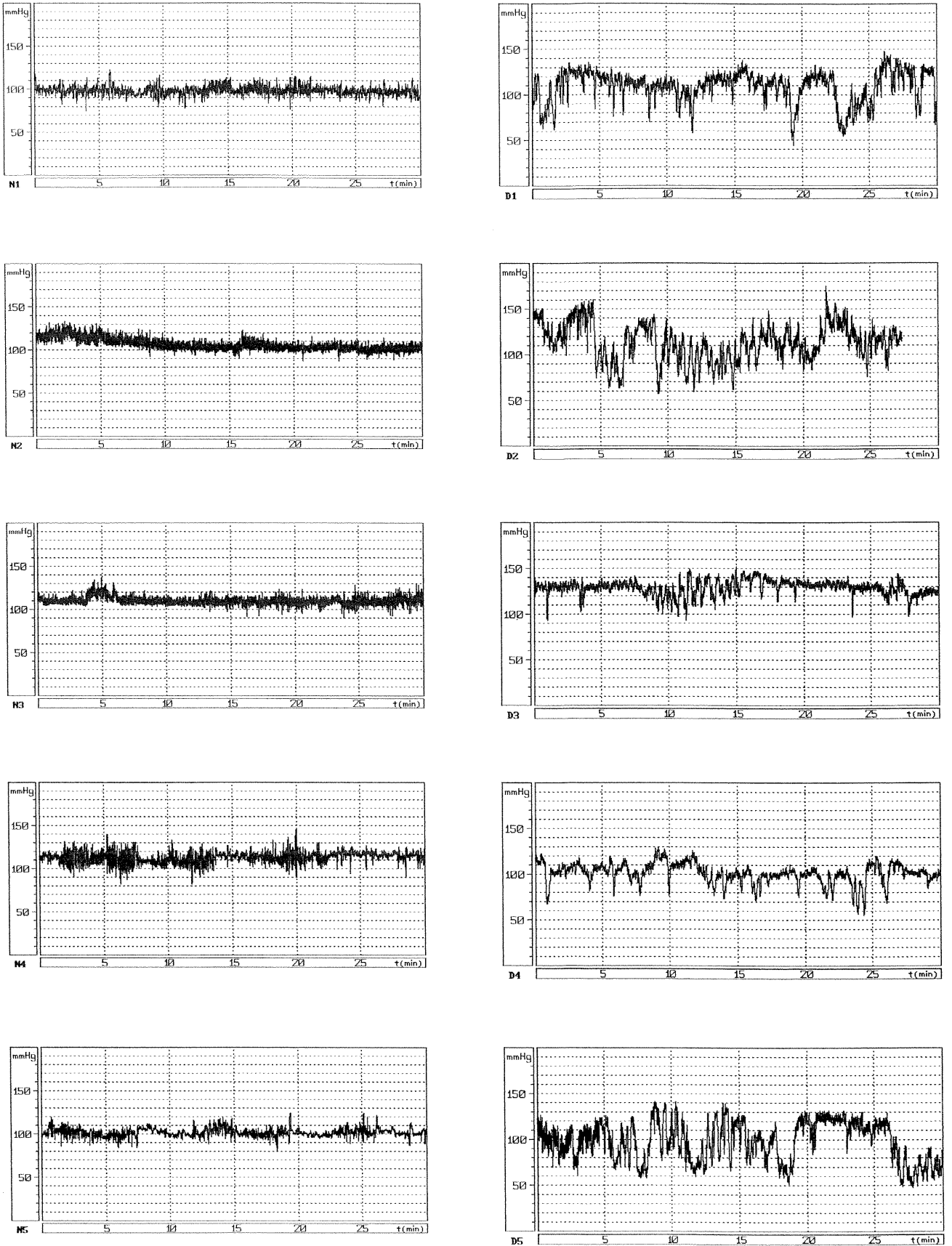
variável no tempo (  $dpam/dt$ ). No gráfico de fase, a representação da sequência de eventos e da sua taxa de variação geram uma trajetória que retrata a evolução temporal do sistema. Para facilitar a visualização, as trajetórias resultantes foram interpoladas usando “spline” cúbico.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os dados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. As comparações entre ratos íntegros e ratos com desnervação sinoaórtica, em relação a todos os resultados obtidos, foram feitas através de teste t de Student para amostras independentes. As comparações entre as pressões sistólica e diastólica foram feitas através de teste t de Student para amostras pareadas. O nível de significância de 5% foi escolhido previamente para todos os testes realizados.

## **RESULTADOS**

A análise dos traçados de pressão arterial revelou um comportamento distinto entre os 2 grupos de ratos estudados. Todos os ratos íntegros apresentaram poucas flutuações no período estudado, ao passo que todos os ratos desnervados apresentaram maior flutuação da pressão arterial (Figura IV - 2). Em 4 ratos desnervados, foi possível identificar que as flutuações da pressão não foram contínuas. Eles apresentaram períodos de estabilidade semelhantes aos dos ratos íntegros, interrompidos por reduções abruptas e fugazes da pressão arterial. Este comportamento não foi identificado no rato desnervado número 2, no



**Figura IV – 2** – Séries temporais de pressão arterial média de 5 ratos íntegros (à esquerda) e de 5 ratos submetidos à deservação sinoaórtica (à direita). t = tempo; mmHg = milímetros de mercúrio.

qual a pressão arterial apresentou grandes flutuações tanto positivas como negativas durante todo o período estudado. Apesar das diferenças de comportamento observadas nos traçados, não houve diferença significativa entre as médias da pressão arterial sistólica, diastólica e média de ratos íntegros, quando comparadas às médias de ratos com desnervação sinoaórtica ( Tabela IV - 1 ).

**Tabela IV - 1.** Médias e variabilidades das pressões sistólica, diastólica e média em ratos íntegros e ratos com desnervação sinoaórtica.

	<b>Íntegros</b>	<b>Desnervação sinoaórtica</b>	<b>p</b>
<b>Médias</b>			
PAS (mmHg)	126,8 ± 4,1	132 ± 5,9	0,5
PAD (mmHg)	88,4 ± 2	92,2 ± 5,2	0,5
PAM (mmHg)	106,3 ± 2,7	110,3 ± 5,4	0,5
<b>Variabilidade da PAS</b>			
DP (mmHg)	6,1 ± 0,4	15,1 ± 2,5	0,007
P <sub>1</sub> (UA)	68,8 ± 4,7	71,2 ± 1,6	0,6
P <sub>2</sub> (mmHg)	30 ± 1,4	67,6 ± 9	0,003
P <sub>3</sub> (mmHg)	69 ± 4,3	62 ± 1,2	0,1
MN (UA)	144 ± 18,1	296 ± 37,1	0,006
<b>Variabilidade da PAD</b>			
DP (mmHg)	5,5 ± 0,4	14,8 ± 2,6	0,007
P <sub>1</sub> (UA)	58,4 ± 3,7	64,8 ± 1,9	0,2
P <sub>2</sub> (mmHg)	29,2 ± 1,7	68,4 ± 8,5	0,002
P <sub>3</sub> (mmHg)	63 ± 4,9	58 ± 3,4	0,4
MN (UA)	109 ± 15,21	260 ± 42,4	0,01
<b>Variabilidade da PAM</b>			
DP (mmHg)	5,6 ± 0,4	15,5 ± 2,7	0,006
P <sub>1</sub> (UA)	54,4 ± 1	59,64 ± 2,4	0,08
P <sub>2</sub> (mmHg)	31,4 ± 1,9	69,2 ± 7,8	0,002
P <sub>3</sub> (mmHg)	57 ± 5,1	47 ± 2,5	0,1
MN (UA)	97,7 ± 11,1	199 ± 34,4	0,023

PAS - pressão arterial sistólica; PAD - pressão arterial diastólica; PAM - pressão arterial média; DP - desvio padrão; mmHg - milímetros de mercúrio; UA - unidades arbitrárias

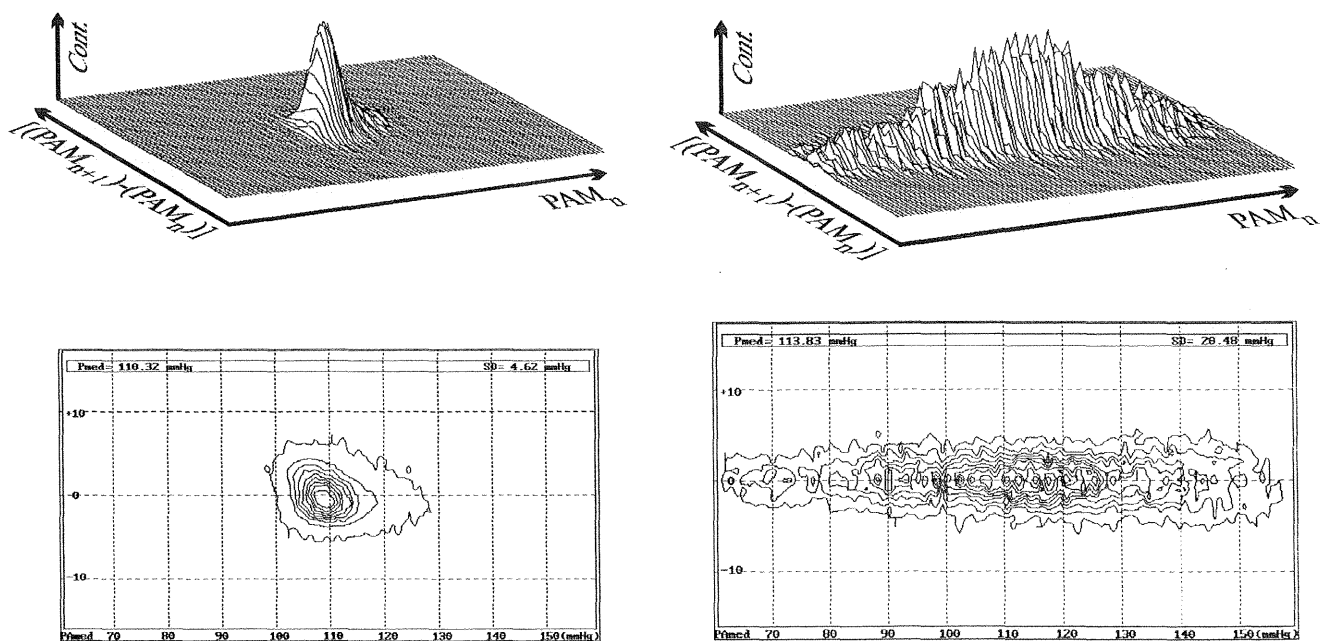
## ***VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL***

Os desvios padrão das pressões arteriais sistólica, diastólica e média foram significativamente maiores nos ratos com desnervação sinoaórtica quando comparados aos ratos íntegros ( Tabela IV - 1 ). A variabilidade da pressão arterial, expressa pelo mapa de retorno tridimensional, foi maior nos ratos submetidos à desnervação sinoaórtica, como mostram os exemplos representativos do mapa de retorno tridimensional de um rato íntegro e de um rato desnervado, apresentados na figura Figura IV - 3. Os índices derivados do Mapa de Retorno Tridimensional, calculados para as pressões arteriais média, sistólica e diastólica, com exceção do P3, apresentaram uma tendência a serem maiores nos ratos com desnervação sinoaórtica, sendo que P2 e MN foram significativamente maiores ( Tabela IV - 1 ).

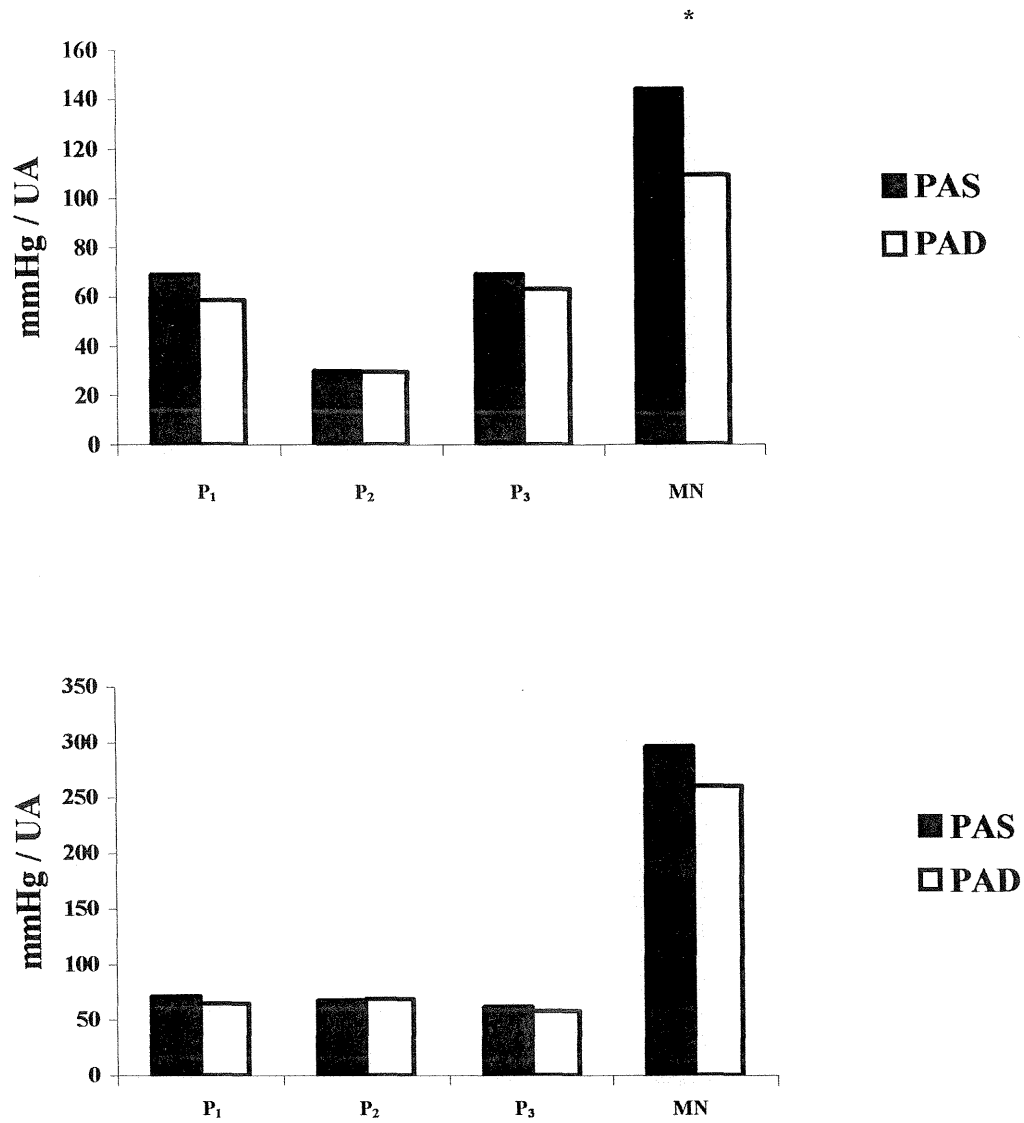
Na comparação do desvio padrão da pressão arterial sistólica ( $6,1 \pm 1,0$  mm Hg) em relação à diastólica ( $5,5 \pm 0,8$  mm Hg) de ratos íntegros, não foi observada nenhuma diferença significativa. Da mesma forma, os valores de P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>, da pressão arterial sistólica, foram semelhantes aos da diastólica. O índice global MN, por sua vez, revelou maior variabilidade da pressão arterial sistólica, comparada à diastólica (Figura IV - 4). Nos ratos com desnervação sinoaórtica, não observamos nenhuma diferença na variabilidade da pressão sistólica em relação à diastólica, tanto para o desvio padrão, como para os índices do mapa de retorno tridimensional (Figura IV - 4).

## ***GRÁFICOS DE FASE***

A análise qualitativa do comportamento da pressão arterial, através de gráficos de



**Figura IV – 3** – Exemplos representativos do mapa de retorno tridimensional de 30 min em um rato íntegro (esquerda) e em um submetido à desnervação sinoaórtica (direita). Apresentação em 3 dimensões e em curvas de nível.



**Figura IV – 4** - Comparação entre a variabilidade da pressão arterial sistólica versus a pressão arterial diastólica de ratos íntegros (superior) e de ratos com desnervação sinoaórtica (inferior). Teste t pareado. \*  $P < 0,05$ . mmHg = milímetros de mercúrio (P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>). UA = unidades arbitrárias (P<sub>1</sub> e MN).



fase seqüenciais por períodos equivalentes a 700 batimentos cardíacos, revelou comportamentos distintos entre os ratos íntegros (Figura IV - 5) e os com desnervação sinoaórtica (Figura IV - 6). A estabilidade encontrada no traçado de pressão arterial de todos os ratos íntegros (Figura IV - 2), sem aumentos ou reduções abruptas dos valores pressóricos, se traduziu por gráficos de fase com trajetórias oscilando em torno de um determinado valor de pressão arterial em todos os períodos analisados. No grupo de ratos com desnervação sinoaórtica, foi possível identificar dois comportamentos distintos. Em 4 ratos, os traçados de pressão arterial apresentaram períodos de estabilidade muito semelhantes aos dos ratos íntegros, intercalados por reduções abruptas e fugazes da pressão arterial (Figura IV - 3). A análise dos períodos de estabilidade geraram gráficos de fase semelhantes aos dos ratos íntegros (Figura IV - 7). Os períodos contendo reduções abruptas e fugazes da pressão arterial traduziram-se por gráficos de fase com predomínio de trajetórias em determinados valores pressóricos, que eventualmente aumentaram sua amplitude e se deslocaram para a esquerda, para então retornarem à posição inicial. Observamos também que, nos ratos com desnervação sinoaórtica, a posição das trajetórias em torno do ponto de ajuste da pressão arterial variou com o tempo, tanto para a esquerda como para a direita. Em um dos ratos com desnervação sinoaórtica, não foi possível identificar períodos de estabilidade no traçado, que apresentou tanto reduções como elevações da pressão arterial. Apesar disso, os gráficos de fase foram capazes de revelar curtos períodos de estabilidade, representados por trajetórias oscilando em torno do ponto de ajuste. Neste animal, o aumento da amplitude das trajetórias gerou deslocamentos tanto para a esquerda como para a direita do ponto de ajuste.

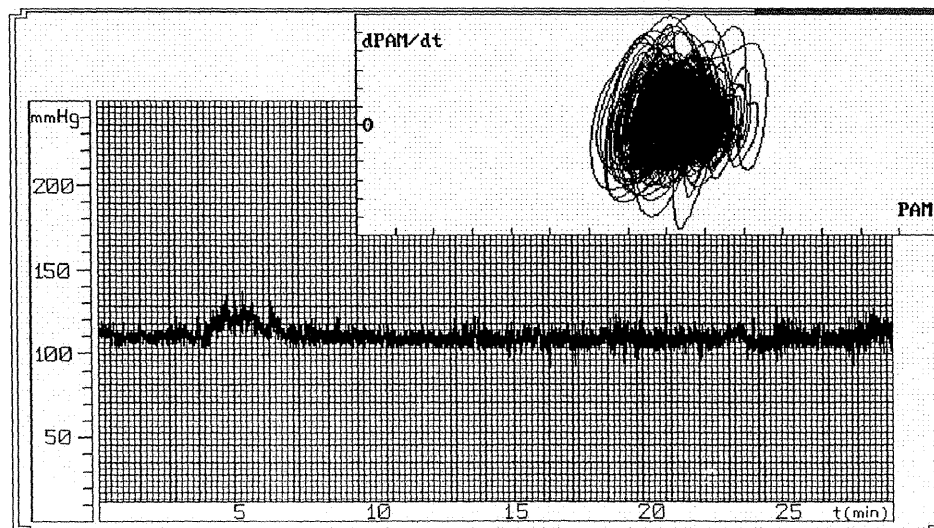
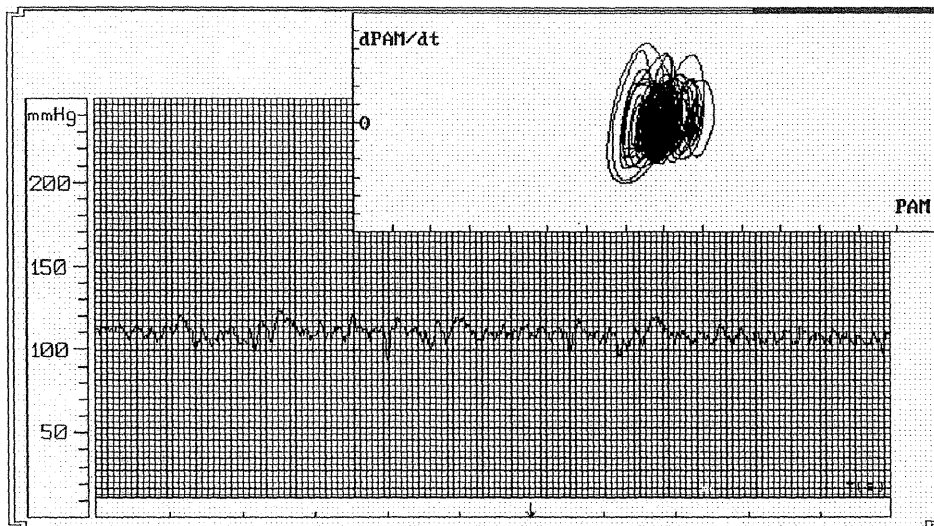
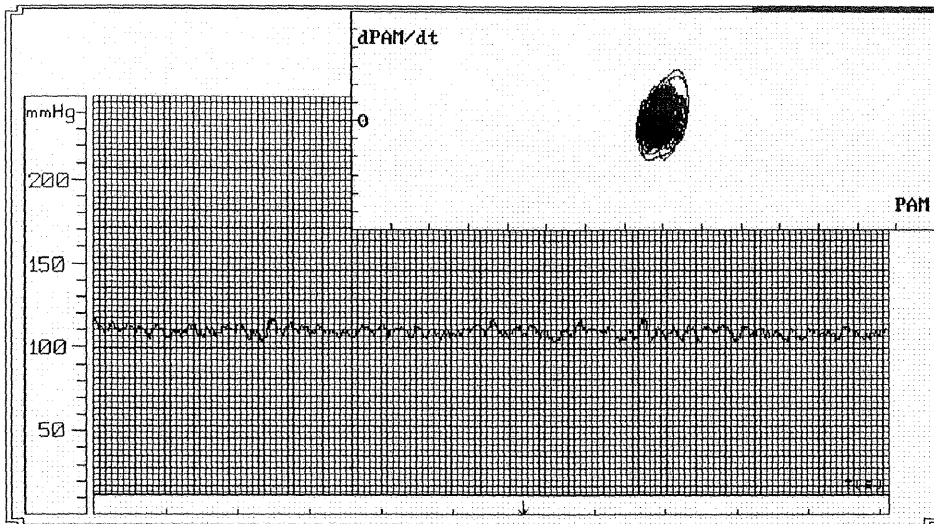


Figura IV – 5 – Séries temporais de pressão arterial média (PAM), em um rato íntegro, com os respectivos gráficos de fase, construídos como PAM x taxa de variação da PAM no tempo ( $dPAM/dt$ ). Partes superior e média: traçados contendo 700 eventos. Parte inferior: traçado contendo 11000 eventos.  $t$  = tempo; mmHg = milímetros de mercúrio.

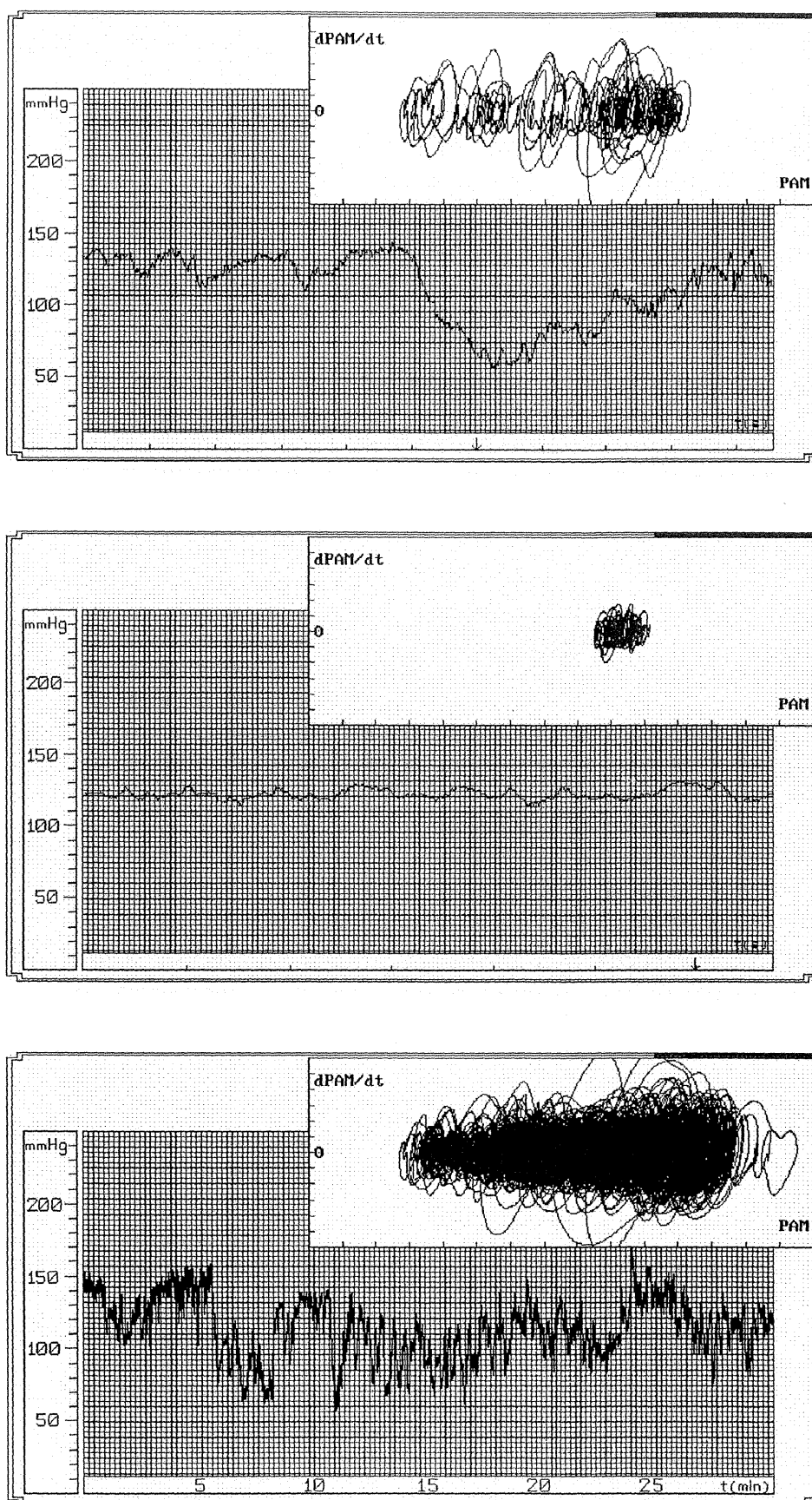


Figura IV – 6 – Séries temporais de pressão arterial média (PAM), em um rato submetido à desnervação sinoaórtica, com os respectivos gráficos de fase, construídos como PAM x taxa de variação da PAM no tempo ( $dPAM/dt$ ). Partes superior e média: traçados contendo 700 eventos. Parte inferior: traçado contendo 11000 eventos.  $t$  = tempo; mmHg = milímetros de mercúrio.

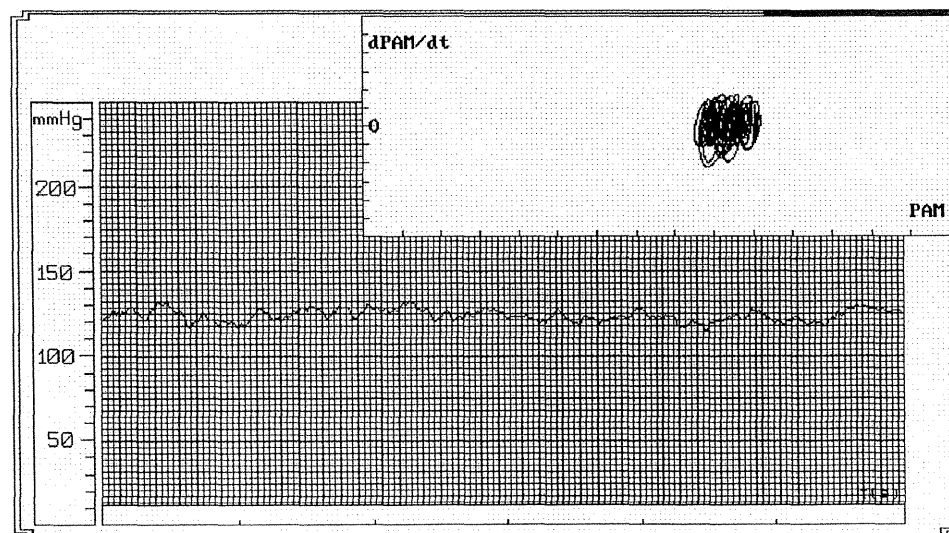
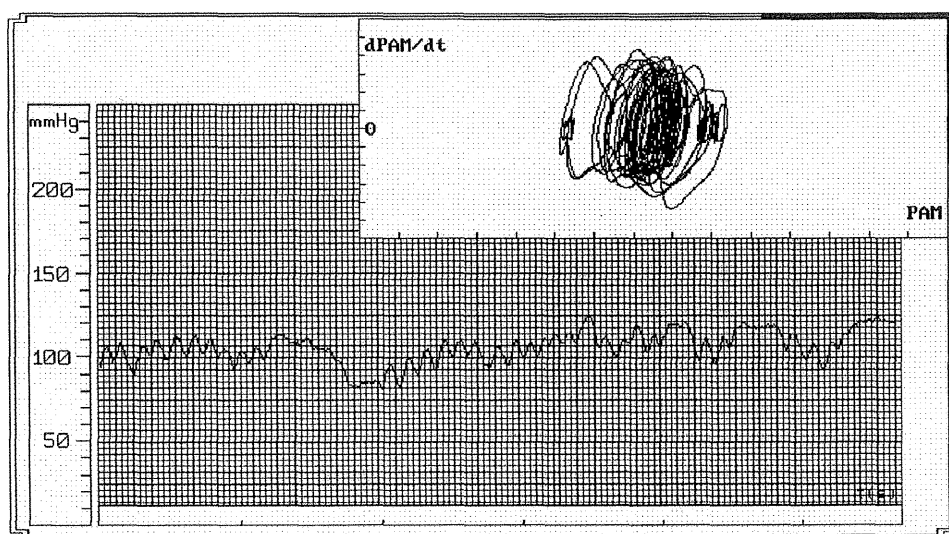
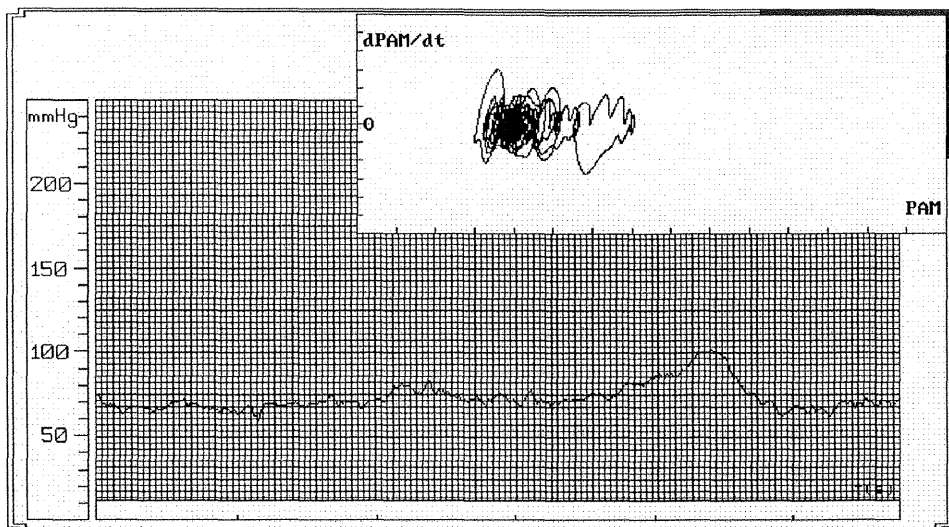


Figura IV – 7 – Séries temporais de pressão arterial média (PAM), em um rato submetido à desnervação sinoaórtica, com os respectivos gráficos de fase, construídos como PAM x taxa de variação da PAM no tempo ( $dPAM/dt$ ). Cada um dos 3 traçados contém 700 eventos.  $t$  = tempo; mmHg = milímetros de mercúrio.

## DISCUSSÃO

### *DESNERVAÇÃO SINOAÓRTICA*

Neste estudo, a eliminação dos pressorreceptores foi realizada com sucesso, evidenciado pela eliminação da sensibilidade barorreflexa, testada pela infusão de drogas pressoras e hipotensoras. Os ratos foram estudados na fase crônica da desnervação sinoaórtica, quando apresentavam níveis pressóricos semelhantes aos dos ratos íntegros. Os ratos com desnervação sinoaórtica apresentaram maior variabilidade da pressão arterial em relação aos ratos íntegros, correspondendo a valores elevados de desvio padrão das pressões arteriais sistólica, diastólica e média.

### *MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL*

O uso do mapa de retorno tridimensional para avaliar a variabilidade da pressão arterial de ratos íntegros e de ratos com desnervação sinoaórtica revelou comportamentos distintos para os 2 grupos. Nos ratos íntegros, a distribuição de pontos mostrou pequena dispersão tanto no eixo transversal como longitudinal, com grande concentração de pontos em torno de um determinado valor de pressão arterial (Figura IV - 4). Aparentemente, esta concentração em torno de um valor pressórico parece corresponder ao ponto de ajuste da pressão arterial.

Nos ratos com desnervação sinoaórtica, a maior variabilidade da pressão arterial traduziu-se por aumento acentuado do eixo longitudinal do mapa de retorno tridimensional,

representado por  $P_2$  (Figura IV - 4 ). O aumento de  $P_2$  indica que a desnervação sinoaórtica aumentou a faixa dinâmica de variação da pressão arterial no período estudado. Tanto a inclinação média da distribuição, medida na região de maior concentração de pontos, representada por  $P_1$ , como a máxima dispersão lateral, representada por  $P_3$ , foram semelhantes nos 2 grupos.

Para entender melhor o comportamento da variabilidade da pressão arterial expressa pelo mapa de retorno tridimensional, analisamos, de forma seqüencial, os traçados de pressão arterial através de gráficos de fase. Esse método permitiu avaliar qualitativamente o comportamento da variabilidade da pressão arterial, acrescentando à análise a variável tempo (96). Nos ratos íntegros, os gráficos de fase apenas reforçaram o que já havia sido demonstrado pelo mapa de retorno tridimensional, ou seja, durante todo o período o sistema permaneceu estável, oscilando em torno de um determinado valor pressórico (Figura IV - 6). Nos ratos com desnervação sinoaórtica, foi possível identificar outros comportamentos (Figura IV - 7). Nesses ratos, a pressão arterial não oscilou em torno de apenas um ponto de ajuste, mas em torno de diversos “pontos de ajuste”. Enquanto oscilava em torno de um determinado ponto de ajuste, a pressão arterial apresentou, intermitentemente, deslocamentos das trajetórias no eixo longitudinal. O aumento de  $P_2$  nos ratos com desnervação sinoaórtica parece ser o somatório dos constantes deslocamentos das trajetórias, afastando-se dos diversos “pontos de ajuste”. Curiosamente, o comportamento durante períodos de estabilidade pressórica foi muito semelhante nos 2 grupos estudados, indicando que, nos ratos com desnervação sinoaórtica, a variabilidade da pressão arterial não está constantemente aumentada. Apesar da grande variabilidade da pressão arterial encontrada nos ratos com desnervação sinoaórtica, o mapa de retorno tridimensional

revelou que a pressão arterial tendeu a agrupar-se em torno de um ponto de ajuste, situado à direita da distribuição de pontos, traduzido pela localização de  $P_1$ , e a deslocar-se preferencialmente deste ponto de ajuste para a esquerda.

A análise conjunta dos traçados de pressão arterial e dos gráficos de fase sugere que as alterações pressóricas abruptas, decorrentes das mudanças de comportamento, possam ser as principais responsáveis pela variabilidade da pressão arterial dos ratos com desnervação sinoaórtica (24). Em nosso estudo, da mesma forma que relatado por Buchholz et al. (27), observamos que os ratos com desnervação sinoaórtica apresentaram maior tendência para reduções do que para elevações da pressão arterial. Contudo, sempre que ocorreram mudanças abruptas, a pressão arterial tendeu a retornar a um comportamento estável, muito semelhante ao dos ratos íntegros.

#### ***VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA VERSUS DIASTÓLICA***

Ao comparar o comportamento dos índices do mapa de retorno tridimensional, calculados para as pressões sistólica e diastólica de ratos íntegros, observamos que a pressão sistólica apresentou maior variabilidade do que a diastólica, traduzida por valores significativamente maiores do índice global MN. Os ratos com desnervação sinoaórtica apresentaram valores mais elevados da variabilidade da pressão arterial, tanto sistólica quanto diastólica, quando comparados aos ratos íntegros, mas desapareceu a diferença existente entre elas. Nota-se que a perda do controle pressórico pelos pressorreceptores aumentou proporcionalmente mais a variabilidade da pressão arterial diastólica do que a sistólica. Estes resultados talvez possam ser explicados pelo efeito exercido pelos

pressorreceptores sobre o acoplamento entre as pressões sistólica e diastólica. Di Rienzo et al. estudaram, através da análise de coerência, o efeito da desnervação sinoaórtica sobre este acoplamento. Os autores encontraram um aumento no grau de acoplamento, após a retirada dos pressorreceptores, indicando que estes atuam limitando o acoplamento entre as pressões sistólica e diastólica (141).

Os desvios padrão das pressões arteriais sistólica e diastólica foram semelhantes nos dois grupos estudados, sugerindo que o desvio padrão não foi capaz de detectar parte da modulação responsável pela variabilidade da pressão arterial, detectada pela abordagem não-linear, através do mapa de retorno tridimensional. Isto talvez possa ser explicado, em parte, pelas características não-lineares da modulação da pressão arterial, demonstradas por diversos autores, que estudaram a modulação da pressão arterial usando ferramentas específicas de estudo dos sistemas dinâmicos não-lineares (101, 98, 102, 142). Através do cálculo do coeficiente de Lyapunov e da dimensão de correlação de séries temporais de pressão arterial de cães íntegros e de cães submetidos à desnervação sinoaórtica, a ação dos pressorreceptores mostrou ser responsável pelo nível de complexidade e de caos nos mecanismos de controle da pressão arterial. As séries temporais de cães desnervados apresentaram menor grau de complexidade do que a de cães íntegros, apesar da variabilidade da pressão arterial ser maior nos cães com desnervação sinoaórtica (135).

Outra evidência de não-linearidade da variabilidade da pressão arterial deve-se ao comportamento dos mecanismos de ajuste desencadeados por quedas ou elevações da pressão arterial. A modulação exercida pelos pressorreceptores apresenta comportamento sigmoideal, modulando a pressão arterial de forma mais eficiente em torno dos valores pressóricos médios e diminuindo a eficiência quando os valores são extremos, tanto



superiores como inferiores (1).

Outra razão para o desvio padrão não detectar aspectos da variabilidade da pressão arterial pode estar associada a aspectos puramente matemáticos. O desvio padrão descreve a variabilidade da pressão arterial como dispersão em torno de uma pressão média, mas para isto pressupõe que os dados analisados apresentam distribuição normal. Os histogramas de frequência da distribuição da pressão arterial média dos ratos íntegros aproximou-se de uma distribuição normal, mas a distribuição de alguns ratos com desnervação sinoaórtica claramente não apresentou características de normalidade, como já descrito por outros autores (27).

É importante ressaltar que a análise do comportamento da variabilidade da pressão arterial através do mapa de retorno tridimensional e de gráficos de fase não permite tirar conclusões sobre o grau de complexidade da modulação pressórica. Apesar de termos encontrado períodos de estabilidade nos ratos com desnervação sinoaórtica, muito semelhantes aos dos ratos íntegros, isoladamente, isto não nos autoriza a afirmar que o comportamento em torno dos “pontos de ajuste” de ambos apresenta realmente as mesmas características. Para tanto, o comportamento em torno dos “pontos de ajuste” deveria ser avaliado através do cálculo das divergências entre as trajetórias através do tempo, utilizando-se o coeficiente de Lyapunov (143).

Os nossos dados indicam que os índices derivados do mapa de retorno tridimensional são influenciados pela modulação da pressão arterial pelos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais, os quais parecem atuar de forma distinta sobre as pressões sistólica e diastólica.

## CAPÍTULO V

### DISCUSSÃO GERAL

A análise do comportamento das oscilações batimento a batimento da frequência cardíaca e da pressão arterial representa uma janela pela qual é possível vislumbrar alguns dos mecanismos que regulam o sistema cardiovascular. Devido à grande complexidade inerente aos sistemas biológicos, a representação destes fenômenos torna-se uma tarefa difícil. Além da utilização de métodos lineares, recentemente, abordagens não-lineares, como o mapa de retorno, também começaram integrar o arsenal de recursos disponíveis para estudar o comportamento das oscilações batimento a batimento da frequência cardíaca e da pressão arterial. A escolha do mapa de retorno, como forma de avaliar a regulação cardiovascular, é consequência da sua capacidade de identificar padrões de comportamento em sistemas complexos.

O mapa de retorno tridimensional foi desenvolvido como uma tentativa de descrever melhor o comportamento desse sistema e para permitir a quantificação dos resultados obtidos. As principais diferenças deste método, em relação ao mapa de retorno clássico, são as seguintes: 1) utilização da primeira derivada no eixo do y; 2) densidade expressa na terceira dimensão; 3) contorno externo definido automaticamente pelo número mínimo de contagens; 4) quantificação por índices objetivos.

## *MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL DA FREQUÊNCIA CARDÍACA*

A contribuição do mapa de retorno tridimensional da frequência cardíaca ao arsenal de métodos já disponíveis parece ser a sua capacidade de avaliar a modulação simpática sobre o nó sinusal. À exceção de alguns métodos de análise da variabilidade da frequência cardíaca, que são marcadamente representativos da modulação vagal, como RMSSD, PNN50 e os componentes de alta frequência da análise espectral, quase todos os demais, de alguma forma, são capazes de avaliar a modulação vagal sobre o nó sinusal. Por outro lado, mesmo durante períodos de definida atividade simpática, esses índices não são capazes de representar a modulação simpática (115).

Em nosso estudo de bloqueio farmacológico durante os períodos de exercício moderado, a variabilidade da frequência cardíaca estava muito reduzida, em consequência da grande retirada vagal. Nessas condições, a modulação autonômica da frequência cardíaca, aparentemente fica restrita à influência simpática. Apesar disso, a infusão de propranolol aumentou a variabilidade da frequência cardíaca, traduzida pelo aumento de  $P_1$ . Isso não permite afirmar que esse índice represente diretamente a atividade simpática, mas é provável que o comportamento das oscilações da frequência cardíaca, traduzido por  $P_1$ , não acessível pelas abordagens lineares habituais, seja reflexo de mecanismos não-lineares subjacentes, modulados pelo sistema nervoso simpático.

A participação da modulação autonômica no comportamento não-linear da frequência cardíaca já foi abordada por outros autores. Hagerman et al. utilizaram o Coeficiente de Lyapunov para estudar o comportamento caótico da variabilidade da frequência cardíaca em repouso, sob bloqueio autonômico parcial e total e durante exercício

(144). A eliminação da modulação autonômica, através do duplo bloqueio, e a redução do tono vagal com aumento da atividade simpática durante o exercício, não eliminaram o comportamento caótico do sistema, traduzido por valores do Coeficiente de Lyapunov ainda acima de zero. Os achados sugerem que o vago e o simpático modulam parte do comportamento não-linear do sistema, mas não são os únicos responsáveis por ele. Neste estudo, os índices nos domínios do tempo e da frequência apresentaram respostas distintas das apresentadas pelo Coeficiente de Lyapunov, sugerindo que os métodos lineares e não-lineares são complementares, descrevendo aspectos distintos do sistema. Tulppo et al. (145) descreveram padrões de comportamento não-linear nas oscilações da frequência cardíaca, em indivíduos submetidos a ativação simpato-vagal, por infusão de doses progressivas noradrenalina. Utilizando um mapa de retorno bidimensional, observaram a formação de estruturas complexas, com formato de parábola, revelando um padrão sugestivo de dinâmica estocástica, ou de comportamento caótico determinístico. Este comportamento das oscilações da frequência cardíaca não pode ser detectado através da análise espectral.

A análise da disfunção autonômica em pacientes portadores de diabetes melito por métodos não-lineares já foi estudada por outros autores. Mestivier et al. (146) encontraram forte correlação entre os testes autonômicos tradicionais padronizados por Ewing et al. (54) e o mapa de recorrência da frequência cardíaca. Este método permite descrever o comportamento de uma série temporal através do número de vezes que determinadas seqüências de eventos se repetem no tempo. Os autores sugerem que no diabetes melito, a dinâmica da frequência cardíaca é menos complexa, fazendo com que o sistema tenha menos facilidade de adaptar-se às perturbações. Ducher et al. (147) encontraram menor dimensão fractal da frequência cardíaca em pacientes diabéticos, em relação aos indivíduos saudáveis.

Os autores acreditam que o comportamento da dimensão fractal nos pacientes diabéticos seja secundária ao envolvimento vagal precoce. Contudo, o método não foi superior aos métodos lineares utilizados no estudo.

No nosso estudo de disfunção autonômica, os índices do mapa de retorno tridimensional apresentaram melhor acurácia do que os demais índices estudados. Entre eles,  $P_1$  apresentou os melhores resultados, apesar de não correlacionar-se com nenhum dos índices lineares. É possível que o bom desempenho desse índice e a sua independência em relação aos demais índices lineares utilizados seja decorrente das suas características não-lineares e pelo fato dele poder estar representando a modulação simpática. Contudo, não podemos afirmar que os resultados obtidos durante o nosso estudo de bloqueio farmacológico possam ser transpostos para as análises de 24 horas.  $P_1$  foi capaz de avaliar a modulação simpática durante uma intensidade de exercício maior do que a encontrada em registros de 24 horas, com os indivíduos nas suas atividades habituais.

Em estudos preliminares, encontramos evidências indiretas da influência simpática sobre  $P_1$ , calculado a partir de registros de 24 horas (148). Foi avaliado o efeito de uma sessão de exercício em cicloergômetro durante 1 hora sobre os índices do mapa de retorno tridimensional de 24 horas. O eletrocardiograma foi gravado por 2 dias consecutivos, sendo que, em um deles, o exercício era realizado no início da gravação. No dia em que foi realizada a sessão de exercício, foram observados valores de  $P_1$  menores do que os observados no dia sem exercício. Os índices  $P_2$  e  $P_3$  não apresentaram diferenças. Os resultados sugerem que a ativação simpática decorrente da atividade física possa ter influenciado o comportamento da variabilidade da frequência cardíaca no restante do dia, responsável pela diminuição de  $P_1$ . Estudos com bloqueio simpático prolongado durante as

atividades habituais permitirão esclarecer o papel do mapa de retorno na avaliação da modulação simpática de 24 horas.

Além de detectar diferentes níveis de disfunção autonômica em pacientes diabéticos, o mapa de retorno tridimensional também foi capaz de detectar diferenças entre indivíduos normais e maratonistas de elite (149), os quais costumam apresentar grande predominância da modulação vagal. Em pacientes chagásicos ainda sem evidência de cardiopatia, observamos redução isolada de  $P_3$ , sugerindo a presença de comprometimento vagal precoce (150). E na fase mais tardia da doença, já com presença de alterações eletrocardiográficas em repouso, encontramos aumento paradoxal da variabilidade da frequência cardíaca, quando comparada à dos pacientes chagásicos sem cardiopatia, evidenciado por aumento de  $P_1$  (151). Estes achados provavelmente são consequência de disfunção do nó sinusal, presente em muitos dos pacientes estudados.

### ***MAPA DE RETORNO TRIDIMENSIONAL DA PRESSÃO ARTERIAL***

O comportamento das oscilações da pressão arterial, avaliado pelos índices do mapa de retorno tridimensional, revelou que os pressoreceptores e quimiorreceptores arteriais são responsáveis por manter uma estreita faixa dinâmica de variação da pressão arterial, representada por  $P_2$  e que os índices  $P_1$  e  $P_3$  aparentemente são pouco influenciados pela atividade barorreflexa.

$P_1$  é baseado na inclinação média da distribuição de pontos, calculada na região de maior densidade, que provavelmente corresponde ao ponto de ajuste da pressão arterial. Como a desnervação sinoaórtica promoveu grande dispersão longitudinal, era esperado que

ocorresse menor concentração de pontos em torno do ponto de ajuste, fazendo com que  $P_1$  aumentasse. Contudo, analisando o comportamento da pressão arterial através dos gráficos de fase, apesar das órbitas se deslocarem longitudinalmente, foi possível identificar uma tendência do sistema de, periodicamente, retornar a um determinado ponto de ajuste.

Apesar de, neste estudo, não termos analisado a variabilidade da pressão arterial através de análise espectral, algumas considerações podem ser feitas para tentar explicar os mecanismos responsáveis pelo comportamento dos índices  $P_2$  e  $P_3$ .  $P_2$  é baseado nas maiores e menores pressões arteriais que ocorreram pelo menos 3 vezes durante o período analisado, refletindo apenas oscilações lentas da pressão arterial, podendo corresponder aos componentes de baixa frequência da análise espectral (0,005 a 0,05 Hz). Nos ratos com desnervação sinoaórtica, a potência espectral dos componentes de baixa frequência é de 10 a 100 vezes maior do que no ratos íntegros (139), sendo este aumento, em grande parte, devido ao aumento da atividade simpática (38). Como a variabilidade da pressão arterial nos ratos com desnervação sinoaórtica, analisada através do mapa de retorno tridimensional, manifestou-se por aumento isolado de  $P_2$ , é possível que ele e os componentes de baixa frequência estejam refletindo o mesmo fenômeno, não podendo ser descartada a possibilidade de  $P_2$  também representar a modulação simpática sobre a variabilidade da pressão arterial.

$P_3$  é baseado na máxima dispersão transversal da distribuição de pontos, refletindo as maiores flutuações instantâneas da pressão arterial no período estudado. As flutuações instantâneas da pressão arterial são responsáveis pelos componentes de alta frequência da análise espectral, afetadas em grande parte pelos efeitos mecânicos da respiração, com pouca influência autonômica (41, 152). No rato, elas correspondem a oscilações em torno

de 2 Hz, (42) as quais não são afetadas significativamente pela desnervação sinoaórtica (38). Em nosso estudo, também não encontramos diferenças nos valores de  $P_3$  nos dois grupos estudados. Acreditamos que este índice possa estar correlacionado com os componentes de alta frequência da análise espectral, sendo dependente da respiração.

Outros estudos já utilizaram o mapa de retorno tridimensional de pressão arterial. Schaan et al., empregaram o mapa de retorno tridimensional de pressão arterial para estudar ratos com diabetes melito induzido por estreptozotocina (136). Os animais foram tratados com insulina, 7, 14, 30 e 120 dias após a administração da estreptozotocina. Aos 7 dias, observou-se diminuição dos índices  $P_1$ ,  $P_2$  e MN nos ratos diabéticos, quando comparados aos controles, sem alteração dos valores de  $P_3$ . Esta menor variabilidade da pressão arterial foi acompanhada de aumento da variabilidade da frequência cardíaca, calculada pelo desvio padrão dos intervalos RR, sugerindo uma inesperada melhora da modulação autonômica nas fases iniciais da doença.

Lacchini et al. (153) utilizaram o mapa de retorno tridimensional para estudar a variabilidade da pressão arterial em ratos submetidos a sobrecarga salina e a bloqueio do óxido nítrico. A sobrecarga salina promoveu aumento na variabilidade da pressão arterial, representado por valores de  $P_1$  e  $P_2$  superiores aos dos controles. Após bloqueio do óxido nítrico, a variabilidade da pressão arterial retornou aos valores de controle, sugerindo que o aumento na produção do óxido nítrico tem um papel importante na adaptação à sobrecarga salina.

Estudos adicionais em ratos desnervados, envolvendo bloqueio autonômico parcial e total, com controle da ventilação, talvez possam esclarecer a influência da modulação autonômica e da ventilação sobre o comportamento dos índices do mapa de retorno



tridimensional. Estudos em seres humanos ainda não foram realizados, mas com a atual disponibilidade de equipamentos de monitorização prolongada da pressão arterial (154, 155), no futuro, poderá ser avaliada a aplicabilidade clínica do método.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSÕES

1 - Os índices do mapa de retorno tridimensional são sensíveis e específicos para detectar diferentes níveis de disfunção autonômica, em pacientes portadores de diabetes melito.

2 - Os índices do mapa de retorno tridimensional são reprodutíveis, quando avaliam a variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos normais e em pacientes portadores de diabetes melito com diagnóstico de neuropatia autonômica.

3 - Os índices do mapa de retorno tridimensional são capazes de quantificar, de forma independente, as modulações parassimpática e simpática sobre o nó sinusal.

4 - Os índices do mapa de retorno tridimensional são capazes de detectar diferenças no comportamento da variabilidade das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, secundárias à eliminação dos pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais.

5 - Os índices do mapa de retorno tridimensional são capazes de detectar diferenças entre o comportamento da variabilidade da pressão arterial sistólica, quando comparado ao comportamento da variabilidade da pressão arterial diastólica em ratos íntegros. Sugerindo que os pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais modulam de forma distinta as pressões arteriais sistólica e diastólica.

## Anexo 1 – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO (Convite para juntar-se ao estudo da variabilidade da frequência cardíaca em indivíduos com diabetes melito e normais).

Este estudo, que está sendo realizado no Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, visa entender melhor o funcionamento do sistema cardiovascular. O padrão da variabilidade do batimento cardíaco tem sido muito estudado como uma forma de avaliar o grau de comprometimento do sistema nervoso autônomo em indivíduos com diabetes melito, pois os testes existentes até então não são práticos e às vezes de difícil reprodução. Assim, esta pesquisa se propõe a avaliar a frequência cardíaca através da gravação do eletrocardiograma durante 24 horas do dia em indivíduos com diabetes melito e em pessoas normais. O sistema de gravação Holter de 24 horas é feito com a instalação de cinco eletrodos conectados a um gravador de bolso. Este aparelho funciona com uma pilha, não existindo o risco de choque elétrico ou queimadura. A colocação e retirada do aparelho são realizadas pelos pesquisadores. O estudo não compreende quaisquer exames extras ou uso de medicamentos.

Se você tiver qualquer dúvida antes de decidir em participar ou não do estudo, sinta-se à vontade para fazê-lo.

Ass

\_\_\_\_\_  
Participante

Ass

\_\_\_\_\_  
Responsável/orientador  
Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

## Anexo 2 – Termo de Consentimento

### Termo de Consentimento

Este estudo, que será realizado no Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, visa entender melhor o funcionamento do sistema cardiovascular. Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que se propõe a avaliar o padrão dos batimentos cardíacos em diversas situações, em indivíduos normais e com patologias. A frequência cardíaca de diversos indivíduos já foi analisada com este método. O trabalho será realizado em indivíduos normais e segue os seguintes passos:

1º dia) visita ao laboratório e realização de teste de esforço em bicicleta ergométrica;  
2º, 3º, 4º e 5º dia) acesso, com uma agulha fina, a uma veia do antebraço, gravação do eletrocardiograma, injeção de água destilada ou propranolol ou atropina ou propranolol e atropina de forma aleatória. Após 10 minutos da infusão das drogas, será realizado um protocolo de exercício e repouso igual para os quatro dias. Serão 40 minutos de repouso seguidos de 20 minutos de exercício, com gravação do eletrocardiograma durante esse período. A gravação é feita com a instalação de cinco eletrodos conectados a um gravador de bolso. Esse aparelho funciona com uma pilha de 9v, não existindo o risco de choque elétrico ou queimadura. A colocação e retirada do aparelho são realizados pelos pesquisadores. O estudo não compreende quaisquer exames extras.

As drogas utilizadas podem desencadear reações não desejadas, mesmo em indivíduos normais. O propranolol pode causar crise de asma (chiado no peito), baixar a frequência do

coração e a pressão, levando a tontura, mal estar, náusea. A atropina pode levar a secura na boca, aumento da frequência do coração, visão borrada, palpitação, alteração da fala, dor de cabeça, constipação, retenção urinária. É importante ressaltar que estes efeitos geralmente são leves e infreqüentemente ocorrem. Para ambas as drogas existem antídotos (drogas que reverterem o efeito) e estarão disponíveis, se for necessário utilizá-las. Se ocorrer algum efeito adverso, dano, trauma durante o momento da realização do protocolo do estudo, os participantes serão idenizados pelos pesquisadores e receberão total orientação e apoio.

Os dados da pesquisa serão utilizados apenas pelos pesquisadores, mantendo-se confidenciais os achados, sendo utilizados apenas em publicações científicas sem identificação dos participantes.

Se você tiver qualquer dúvida antes de decidir participar ou não do estudo, sinta-se à vontade para fazê-lo. Você pode decidir parar com o estudo em qualquer momento.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado da natureza, dos objetivos, metodologia e dos riscos do estudo e concordo em participar do mesmo voluntariamente.

Porto Alegre, de \_\_\_\_\_ de 1996.

Ass \_\_\_\_\_  
Participante

Ass \_\_\_\_\_  
Responsável/orientador  
Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

**BIBLIOGRAFIA**

1. Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 1995; 25: 1276-1286.
2. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991;84:482-492.
3. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Barger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuations: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981; 213:220-222.
4. Appel ML, Berger RD, Saul JP, Smith JM, Cohen RJ. Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music? *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 1139-1148.
5. Task Force of The European Society of Cardiology and the North American Society for Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 1996; 93: 1043-1065.
6. Nolan J, Batin PD, Andrews R, et al. Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98: 1510-1516.
7. La Rovere MT, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. 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* 1998; 351: 478-484.
8. Thames MD, Dibner-Dunlap ME, Smith ML. Mechanisms of arterial baroreflex control. In: Levy MN, Schwartz PJ. *Vagal control of the heart: Experimental basis and*

clinical implications. Armonk, New York: Futura Publishing Company; 1994; 23: 369-380.

9. Franchini KG, Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv System* 1993; 42: 63-70.

10. Billman GE, Schwartz PJ, Stone L. Baroreceptor reflex control of heart rate: a predictor of sudden cardiac death. *Circulation* 1982; 66: 874-880.

11. Sopher SM, Smith ML, Eckberg DL, Fritsch JM, Dibner-Dunlap ME. Autonomic pathophysiology in heart failure: carotid baroreceptor-cardiac reflexes. *Am J Physiol* 1990; 259: 689-696.

12. Chen J-S, Wang W, Bartholet T, Zucker IH. Analysis of baroreflex control of heart rate in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation* 1991; 83: 260-267.

13. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Circ Res* 1964; 15:511-521.

14. Schreihof AM, Sved AF. Use of sinoaortic denervation to study the role of baroreceptors in cardiovascular regulation. *Am J Physiol* 1994; 266:1705-1710.

15. Saavedra JM, Krieger EM. Early increase in adrenomedullary catecholamine synthesis in sinoaortic denervated rats. *J Auton Nerv Syst* 1987; 18: 181-183.

16. Werber AH, Bryan WJ, Fink GD. Hemodynamic and neural mechanisms of acute neurogenic hypertension in the rat. *Am J Physiol* 1984; 247: 991-998.

17. Franchini KG, Krieger EM. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic denervated rats. *Am J Physiol* 1992; 262:677-683.

18. Irigoyen MC, Cestari IA, Moreira ED, Oshiro MS, Krieger EM. Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21:869-872.

19. Alexander N, Morris M. Increased plasma vasopressin in sinoaortic denervated rats. *Neuroendocrinology* 1986; 42: 361-367.
20. Alexander N, Velasquez MT, Decuir M, Maronde RF. Indices of sympathetic activity in the sinoaortic-denervated hypertensive rats. *Am J Physiol* 1980; 238:521-526.
21. Barres C, Lewis SJ, Jacob HJ, Brody MJ. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol* 1992; 263: 639-646.
22. Irigoyen MC, Moreira ED, Ida F, Pires M, Cestari IA, Krieger ED. Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rat. *Hipertension* 1995; 26 {part 2}:1111-1116.
23. Krieger EM, Trindade JrAS. Long term analysis of neurogenic hypertension in the rat. *Proceedings, International Union of Physiological Sciences, XXVIII International Congress, Budapest 1980; 14: 530. Hungarian Physiological Society.*
24. Buchholz RA, Hubbard JW, Keeton TK, Nathan MA. Cardiovascular and neuroendocrine responses to behavioral stress after central or peripheral barodenervation in rats. *Brain Res* 1986; 19: 365-364
25. Machado BH, Mauad H, Glass ML. Transient changes in blood pressure during spontaneous deep breaths in rats with sinoaortic deafferentation. *J Appl Physiol* 1992; 72: 920-924.
26. Mauad H, Glass ML, Machado BH. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability in rat. *Hypertension* 1992; 19(supl II): II-182-II-186.
27. Buchholz RA, Hubbard JW, Nathan MA. Comparison of 1-hour and 24-hour blood pressure recordings in central or peripheral baroreceptor-denervated rats. *Hypertension*



1986; 1154-1163.

28. Alper RH, Jacob HJ, Brody MJ. Regulation of arterial pressure lability in rats with chronic sino-aortic deafferentation. *Am J Physiol* 1987; 253:466-474.
29. Alper RH, Jacob HJ, Brody MJ. Central and peripheral mechanisms of arterial pressure lability following baroreceptor denervation. *Can J Physiol Pharmacol* 1987; 65: 1615-1618.
30. Jacob HJ, Alper RH, Grosskreutz CL, Lewis SJ, Brody MJ. Vascular tone influences arterial pressure lability after sinoaortic deafferentation. *Am J Physiol* 1991; 260: 359-367
31. Franchini KG, Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. In: Ganten D, de Jong W, eds. *Handbook of Hypertension, Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science BV; 1994; 16: 482-500.
32. Akselrod S, Gordon D, Madwed JB, Snidman NV, Shannon DC, Cohen RJ. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am J Physiol* 1985; 249:867-875.
33. Hirsh JA, Bishop B. Respiratory sinus arrhythmia in humans: how breathing pattern modulates heart rate. *Am J Physiol* 1981; 241:620-629.
34. Cerutti C, Gustin MP, Paultre CZ, et al. Role of the autonomic nervous system in blood pressure and heart rate variability in rats: a spectral analysis approach. In: Di Rienzo M, Mancia G, Parati G, Pedotti A, Zanchetti A. *Blood pressure and heart rate variability*. Amsterdam, Netherlands: IOS Press; 1992; 180-191.
35. Preiss G, Polosa C. Patterns of sympathetic neuron activity associated with Mayer waves. *Am J Physiol* 1974; 226: 724-730.
36. Perlini S, Giangregorio F, Coco M, et al. Autonomic and ventilatory components of

heart rate and blood pressure variability in freely behaving rats. *Am J Physiol* 1995; 269: 1729-1734.

37. Kardos A, Rudas L, Gingl Z, Szabados S, Simon J. The mechanism of blood pressure variability. Study in patients with fixed ventricular pacemaker rhythm. *Eur Heart J* 1995; 16: 545-552.

38. Cerutti C, Barres C, Paultre C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol* 1994; 266: 1993-2000.

39. Laitinen T, Hartikainen J, Niskanen L, Geelen G, Länsimies E. Sympathovagal balance is major determinant of short-term blood pressure variability in healthy subjects. *Am J Physiol* 1999; 276: 1245-1252.

40. Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W, et al. Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation* 1990;81:537-547.

41. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interactions in man and conscious dog. *Circ Res* 1986;59:178-193.

42. Japundzic N, Grichois ML, Zitoun P, Laude D, Elghozi JL. Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *J Auton Nerv Syst* 1990; 30: 91-100.

43. Randall DC, Brown DR, Raisch RM, Yimling FD, Randall WC. SA nodal parasympathectomy delineates autonomic control of heart rate power spectrum. *Am J Physiol* 1991; 260:H985-H988.

44. Vybiral T, Bryg RJ, Maddens ME, et al. Effects of transdermal scopolamine on heart

rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 1990;65:604-608.

45. Malik M, Camm AJ. Components of heart rate variability - What they really mean and what they really measure. *Am J Cardiol* 1993; 72: 481-482.

46. Hedman A, Hartikainen J, Hakumäki M. Physiological background underlying short-term heart rate variability. *A.N.E.* 1998; 3(3):267-280.

47. Malliani A. Association of heart rate variability components with physiological regulatory mechanisms. In: Malik M, Camm AJ: *Heart rate variability*. Armonk, NY. Futura Publishing Company; 1992; 173-188.

48. Lombardi F, Torzillo D, Sandrone G, et al. Beta-blocking effect of propafenone based on spectral analysis of heart rate variability. *Am J Cardiol* 1992;70:1028-1034.

49. Tygesen H, Claes G, Drott C, et al. Effect of endoscopic transthoracic sympathectomy on heart rate variability in severe angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1447-1452.

50. Coumel P, Hermida JS, Wennerblöm B, Leenhardt A, Maison-Blanche P, Cauchemez B. Heart rate variability in left ventricular hypertrophy and heart failure, and the effects of beta-blockade. A non-spectral analysis of heart rate variability in the frequency domain and in the time domain. *Eur Heart J* 1991;12:412-422.

51. Albrecht P, Cohen RJ. Estimation of heart rate power spectrum bands from real-world data: dealing with ectopics beats and noisy data. *Comput Cardiol* 1989;15:311-314.

52. Saul PJ, Albrecht P, Berger RD, Cohen RJ. Analysis of long term heart rate variability: methods, 1/f scaling and implications. *Comput Cardiol Conference, Leuven* 1987: 419-422.

53. Dougherty CM, Burr RL. Comparison of heart rate variability in survivors and nonsurvivors of sudden cardiac arrest. *Am J Cardiol* 1992;70:441-448.

54. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care* 1985;8:491-498.
55. American Diabetes Association. Standardized measures in diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18(supl 1):59-82.
56. Ryder REJ, Hardisty CA. Which battery of cardiovascular autonomic function tests? *Diabetologia* 1990;33:177-179.
57. Ewing DJ. Which battery of cardiovascular autonomic function tests? *Diabetologia* 1990;33:180-181.
58. Wieling W, Van Lieshout JJ. The assessment of cardiovascular reflex activity: standardization is needed. *Diabetologia* 1990;33:182-183.
59. Lawrence GP, Home PD, Murray A. Repeatability of measurements and sources of variability in tests of cardiovascular autonomic function. *Br Heart J* 1992;68:205-211.
60. Vybiral T, Bryg RJ, Maddens ME, Boden WE. Effect of passive tilt on sympathetic and parasympathetic components of heart rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 1989;63:1117-1120.
61. Freeman R, Saul JP, Roberts MS, Berger RD, Broadbridge C, Cohen RJ. Spectral analysis of heart rate in diabetic autonomic neuropathy. A comparison with standard tests of autonomic function. *Arch Neurol* 1991; 48:185-190.
62. Ewing DJ, Neilson JMM, Shapiro CM, Stewart JA, Reid W. Twenty four hour heart rate variability: effects of posture, sleep, and time of day in healthy controls and comparison with bedside tests of autonomic function in diabetic patients. *Br Heart J* 1991;65:239-244.
63. Myers GA, Martin GJ, Magid NM, et al. Power spectral analysis of heart rate variability in sudden cardiac death: Comparison to other methods. *IEEE Trans Bio Eng*

1986;12:1149-1156.

64. Kleiger RE, Bigger JT, Bosner MS, et al. Stability over time of variables measuring heart rate variability in normal subjects. *Am J Cardiol* 1991;68:626-630.

65. Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Correlations among time and frequency domain measures of heart period variability two weeks after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1992;69:891-898.

66. Bigger JT, Fleiss JL, Rolnitzky LM, Steinman RC. Stability over time of heart period variability in patients with previous myocardial infarction and ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol* 1992;69:718-723.

67. Ewing DJ, Neilson JMM, Travis P. New method for assessing cardiac parasympathetic activity using 24 hour electrocardiograms. *Br Heart J* 1984;52:396-402.

68. Kleiger RE, Miller P, Bigger JT, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987;59:256-262.

69. Cripps TR, Malik M, Farrell TG, Camm AJ. Prognostic value of reduced heart rate variability after myocardial infarction: clinical evaluation of a new analysis method. *Br H Journal* 1991;65:14-19.

70. Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart rate variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 687-697.

71. Hull SS Jr, Evans AR, Vanoli E, et al. Heart rate variability before and after myocardial infarction in conscious dogs at high and low risk of sudden death. *J Am Coll Cardiol* 1990;16:978-985.

72. Farrell T, Bashir Y, Cripps T, et al. Risk stratification for arrhythmic events in postinfarction patients based on heart rate variability, ambulatory electrocardiographic variables and signal-averaged electrocardiogram. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 687-697.
73. Odemuyiwa O, Malik M, Farrell T, Bashir Y, Poloniecki J, Camm AJ. Comparison of the predictive characteristics of heart rate variability index and left ventricular ejection fraction for all-cause mortality, arrhythmic events and sudden death after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 68: 434-439.
74. Camm AJ, Fei L. Clinical significance of heart rate variability. In: Moss AJ, Stern S.: *Noninvasive electrocardiology. Clinical aspects of holter monitoring*. London; W.B. Saunders Company Ltd.; 1996; 225-248.
75. Kienzle MG, Ferguson DW, Birkett CL, Myers GA, Berg WJ, Mariano DJ. Clinical, hemodynamic and sympathetic neural correlates of heart rate variability in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1992;69:761-767.
76. Nolan J, Flapan AD, Capewell S, MacDonald T, Neilson JMM, Ewing DJ. Decreased cardiac parasympathetic activity in chronic heart failure and its relation to left ventricular function. *Br Heart J* 1992; 67: 482-486.
77. Tuininga YS, van Veldhuisen DJ, Brouwer J, et al. Heart rate variability in left ventricular dysfunction and heart failure: effects and implications of drug treatment. *Br Heart J*. 1994; 72: 509-513.
78. Horner SM, Murphy CF, Coen B, Dick DJ, Harrison FG, Vespalcova Z. Contribution to heart rate variability by mechanoelectric feedback. Stretch of the sinoatrial node reduces heart rate variability. *Circulation* 1996; 94: 1762-1767.
79. Hilsted J. Pathophysiology in diabetic autonomic neuropathy: cardiovascular,

hormonal and metabolic studies. *diabetes* 1982;31:730-737.

80. Wheeler T, Watkins PJ. Cardiac denervation in diabetes. *Br Med J* 1973;4:584-586.

81. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. Mortality in diabetic autonomic neuropathy. *Lancet* 1976; i: 601-601.

82. Clarke BF, Ewing DJ, Campbell IW. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* 1979;17:195-212.

83. Ewing DJ. Autonomic neuropathy. In: Pickup JC, Williams G, eds. *Textbook of Diabetes*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991:635-647.

84. Malpas SC, Maling TJB. Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. *Diabetes* 1990; 39:1177-1181.

85. Pagani M, Malfatto G, Pierini S, et al. Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. *J Auton Nerv Syst* 1988; 23: 143-153.

86. Lishner M, Akselrod S, Mor Avi V, Oz O, Divon M, Ravid M. Spectral analysis of heart rate fluctuations. A non-invasive, sensitive method for early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J Auton Nerv Syst* 1987; 19: 119-125.

87. Freeman R, Saul JP, Roberts MS, Berger RD, Broadbridge C, Cohen RJ. Spectral analysis of heart rate in diabetic autonomic neuropathy. A comparison with standard tests of autonomic function. *Arch Neurol* 1991; 48:185-190

88. Bellavere F, Balzani I, Masi G, et al. Power spectral analysis of heart-rate variations improves assessment of diabetic cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes* 1992;41:633-40.

89. Ziegler D, Dannehl K, Volksw D, Mühlen H, Spüler M, Gries FA. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis and standard tests of heart-rate variation in newly diagnosed IDDM patients. *Diabetes Care* 1992;15:908-911.

90. Zanchetti A, Mancia G. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension* 1991; 18(supl III): III-13-III-21.
91. Parati G, Frattola A, Di Rienzo M, Castiglioni P, Pedotti A, Mancia G. Effects of aging on 24-h dynamic baroreceptor control of heart rate in ambulant subjects. *Am J Physiol* 1995; 37: 1606-1612.
92. Bertinieri G, Di Rienzo M, Cavallazzi A, Ferrari AU, Pedotti A, Mancia G. New approach to analysis of the arterial baroreflex. *Am J Physiol* 1988; 254: 377-383.
93. Legramante JM, Raimondi G, Massaro M, Cassarino S, Peruzzi G, Iellamo F. Investigating feed-forward neural regulation of circulation from analysis of spontaneous arterial pressure and heart rate fluctuations. *Circulation* 1999; 99: 1760-1766.
94. Parati G, Omboni S, Frattola A, Di Rienzo M, Zanchetti A, Mancia G. Dynamic evaluation of the baroreflex in ambulant subjects. In: Di Rienzo M, Mancia G, Parati G, Pedotti A, Zanchetti A. *Blood pressure and heart rate variability*. Amsterdam, Netherlands: IOS Press; 1992; 123-137.
95. Elbert T, Ray WJ, Kowalik ZJ, Skinner JE, Graf KE, Birbaumer N. Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol Rev* 1994; 74: 1-47.
96. Denton TA, Diamond GA, Helfant RH, Khan S, Karagueuzian H. Fascinating rhythm: A primer on chaos theory and its application to cardiology. *Am Heart J* 1990; 120:1419-1440.
97. Kaplan DT, Goldberger AL. Chaos in cardiology. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1991;2:342-354.
98. Wagner CD, Persson PB. Nonlinear chaotic dynamics of arterial blood pressure and renal blood flow. *Am J Physiol* 1995; 268: 621-627.



99. Babloyantz A, Destexhe A. Is the normal heart a periodic oscillator? *Biol Cybern* 1988; 58: 203-211.
100. Goldberger AL, Rigney DR, West BJ. Chaos and fractals in human physiology. *Sci Am* 1990;262:35-41.
101. Wagner CD, Nafz B, Persson PB. Chaos in blood pressure control. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 380-387.
102. Kanters JK, Hojgaard MV, Agner E, Holstein-Rathlou N-H. Short- and long-term variations in non-linear dynamics of heart rate variability. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 400-409.
103. Ho KKL, Moody GB, Peng C-K, et al. Predicting survival in heart failure case and control subjects by use of fully automated methods for deriving nonlinear and conventional indices of heart rate dynamics. *Circulation* 1997; 96: 842-848.
104. Braun C, Kowallik P, Freking A, Haderl D, Kniffki K, Meesmann M. Demonstration of non-linear components in heart rate variability of healthy persons. *Am J Physiol* 1998;275:1577-1584.
105. Yamamoto Y, Hughson RL, Peterson C. Autonomic control of heart rate during exercise studied by heart rate variability spectral analysis. *J Appl Physiol* 1991;71:1136-42.
106. Nakamura YM, Yamamoto Y, Muraoka I. Autonomic control of heart rate during physical exercise and fractal dimension of heart rate variability. *J Appl Physiol* 1993;74:875-881.
107. Bigger JT, Steinman RC, Rolnitzky LM, Fleiss JL, Albrecht P, Cohen RJ. Power law behavior of RR-interval variability in healthy middle-aged persons, patients with recent acute myocardial infarction, and patients with heart transplants. *Circulation* 1996; 93: 2142-2151.

108. Mäkikallio TM, Hoiber S, Kober L, et al. Fractal analysis of heart rate dynamics as a predictor of mortality in patients with depressed left ventricular function after acute myocardial infarction. TRACE investigators. Trandolapril cardiac evaluation. *Am J Cardiol* 1999; 83: 836-839.
109. Mäkikallio TM, Koistinen J, Jordaens L, et al. Heart rate dynamics before spontaneous onset of ventricular fibrillation in patients with healed myocardial infarcts. *Am J Cardiol* 1999; 83: 880-884.
110. Woo MA, Stevenson WG, Moser DK, Trelease RB, Harper RM. Patterns of beat-to-beat heart rate variability in advanced heart failure. *Am Heart J* 1992;123:704-710.
111. Woo MA, Stevenson WG, Moser DK, Middlekauff HR. Complex heart rate variability and serum norepinephrine levels in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 565-569.
112. Kamen PW, Tonkin AM. Application of the Poincaré plot to heart rate variability: a new measure of functional status in heart failure. *Aust NZ J Med* 1995; 25: 18-26.
113. Copie X, Pousset F, Lechat P, Jaillon P, Guize L, Le Heuzey J-Y, and the Cardiac Insufficiency Bisoprol Study investigators. Effects of  $\beta$ -blockade with bisoprol on heart rate variability in advanced heart failure: analysis of scatterplots of R-R intervals at selected heart rates. *Am Heart J* 1996; 132: 369-375.
114. Keeley EC, Lange RA, Hillis LD, Joglar JA, Page RL. Correlation between time-domain measures of heart rate variability and scatterplots in patients with healed myocardial infarcts and the influence of metoprolol. *Am J Cardiol* 1997; 79: 412-414.
115. Copie X, Le Heuzey J, Iliou M, et al. Correlation between time-domain measures of heart rate variability and scatterplots in postinfarction patients. *PACE* 1996; 19: 342-347.

116. Anan T, Sunagawa K, Araki H, Nakamura M. Arrhythmia analysis by successive RR plotting. *Journal of Electrocardiology* 1990;23:243-248.
117. Huikuri HV, Seppänen T, Koistinen MJ, Airaksinen J, Ikäheimo MJ, Castellanos A, Myerburg RJ. Abnormalities in beat-to-beat dynamics of heart rate before the spontaneous onset of life-threatening ventricular tachyarrhythmias in patients with prior myocardial infarction. *Circulation* 1996; 93: 1836-1844.
118. Raetz SL, Richard CA, Garfinkel A, Harper RM. Dynamic characteristics of cardiac R-R intervals during sleep and waking states. *Sleep* 1991; 4: 256-533.
119. Schechtman VL, Raetz SL, Harper RK, et al. Dynamic analysis of cardiac R-R intervals in normal infants and in infants who subsequently succumbed to the sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 1992; 31: 606-612.
120. Schechtman VL, Harper RK, Harper RM. Development of heart rate dynamics during sleep-waking states in normal infants. *Pediatr Res* 1993; 34: 618-623.
121. Polanczyk CA, Rohde LEP, Moraes RS, Ferlin EL, Leite C, Ribeiro JP. Sympathetic nervous system representation in time and frequency domain indices of heart rate variability. *Eur J Appl Physiol* 1998; 79: 69-73.
122. Hnatkova K, Copie X, Staunton A, Malik M. Numeric processing of Lorenz plots of R-R intervals from long-term ECGs. Comparison with time-domain measures of heart rate variability for risk stratification after myocardial infarction. *J Electrocardiol* 1995;28 (Supl):74-80.
123. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1038-1057.
124. Zaslavsky LMA, Gross JL, Chaves ML, Machado R. Memory dysfunction and

autonomic neuropathy in non-insulin-dependent (type 2) diabetic patients. *Diabetes Res Clin Practice* 1995; 30: 101-110.

125. Rohde LEP, Polanczyk CA, Moraes RS, Ferlin EL, Ribeiro JP. Effect of partial arrhythmia suppression with amiodarone on heart rate variability of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1998; 136: 31-36.

126. Jose AD, Taylor RR. Autonomic blockade by propranolol and atropine to study intrinsic myocardial function in man. *J Clin Invest* 1969; 48: 2019-2031.

127. Maciel BC, Gallo L Jr, Marin-Neto JA, Terra-Filho J, Manco JC . Efficacy of pharmacological blockade of the cardiac parasympathetic system with atropine in normal men. *Braz J Med Biol Res* 1985;18: 303-308.

128. Houle MS, Billamn GE. Low-frequency component of the heart rate variability spectrum: a poor marker of sympathetic activity. *Am J Physiol* 1999; 276: 215-223.

129. Tulppo MP, Mäkikallio TH, Seppänen T, Takala TES, Seppänen T, Huikuri HV. Quantitative beat-to-beat analysis of heart rate dynamics during exercise. *Am J Physiol* 1996; 271: 244-252.

130. Silke B, Riddell JG. Heart rate variability effects of an agonist or antagonists of the beta-adrenoceptor assessed with scatterplot and sequence analysis. *Clin Auton Res* 1998;8:145-153.

131. Ribeiro JP, Ibáñez JM, Stein R. Autonomic nervous control of the heart rate response to dynamic incremental exercise: evaluation of the Rosenblueth-Simeone model. *Eur J Appl Physiol* 1991;62:140-144.

132. Mancía G, Paleari F, Parati G. Early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy: present and future approaches. *Diabetologia* 1997; 40: 482-484.

133. Molgaard H, Christensen PD, Sorensen KE, Christensen CK, Mogensen CE. Association of 24-h cardiac parasympathetic activity and degree of nephropathy in IDDM patients. *Diabetes* 1992; 41: 812-817.
134. Hrushesky WJM, Fader D, Schmitt O, Gilbertsen V. The respiratory sinus arrhythmia: a measure of cardiac age. *Science* 1984;224:1001-1004.
135. Wagner CD, Mrowka R, Nafz B, Persson PB. Complexity and “chaos” in blood pressure after baroreceptor denervation of conscious dogs. *Am J Physiol* 1995; 269: 1760-1766.
136. Schaan BD, Maeda CY, Timm HB, et al. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 1081-1086.
137. Waynforth LC, Flecknel PA. Experimental and surgical technique in the rat. *Acad. Press. London*, 1992.
138. Stornetta RL, Guyenet PG, McCarty RC. Autonomic nervous system of heart rate during baroreceptor activation in conscious and anesthetized rats. *J Auton Nerv Syst* 1987; 20:121-127.
139. Jacob HJ, Ramanathan A, Pan SG, Brody MJ, Myers GA. Spectral analysis of arterial pressure lability in rats with sinoaortic deafferentation. *Am J Physiol* 1995; 269: 1481-1488.
140. Rivera E. Ética, bem-estar e legislação. In: De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, de Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: Winner Graph; 1996; 11-14.
141. Di Rienzo M, Castiglioni P, Parati G, Manci G, Pedotti A. Effects of sino-aortic denervation on spectral characteristics of blood pressure and pulse interval variability: a

wide band approach. *Med & Biol Eng & Comput* 1996; 34: 133-141.

142. Yip K-P, N-H Holstein-Rathlou, Marsh DJ. Chaos in blood flow control in genetic and renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol* 1991; 261: 400-408.

143. Wolf A, Swift JB, Swinney HL, Vastano JA. Determining Lyapunov exponents from time series. *Physica D* 1985; 16: 285-317.

144. Hagerman I, Berglund M, Lorin M, Nowak J, Sylvén C. Chaos-related deterministic regulation of heart rate variability in time- and frequency domains: effects of autonomic blockade and exercise. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 410-418.

145. Tulppo MP, Mäkikallio TH, Seppänen T, Airaksinen JKE, Huikuri HV. Heart rate dynamics during accentuated sympathovagal interaction. *Am J Physiol* 1998; 274: 810-816.

146. Mestivier D, Chau NP, Chanudet X, Bauduceau B, Larroque P. Relationship between diabetic autonomic dysfunction and heart rate variability assessed by recurrence plot. *Am J Physiol* 1997; 272:1094-1099.

147. Ducher M, Cerutti C, Gustin MP, et al. Noninvasive exploration of cardiac autonomic neuropathy. Four reliable methods for diabetes? *Diabetes Care* 1999; 22:388-93.

148. Moraes RS, Ferlin EL, Perez G, et al. *Journal of Ambulatory Monitoring (resumo)*1994; 7: 93.

149. Moraes RS, Ferlin EL, Polanczyk C, Cavalcanti AV, Ribeiro JP. Detection of different levels of 24-hour heart rate variability with the three-dimensional return map. *Eur Heart J (resumo)*1994; 15(Supl): 83.

150. Moraes RS, Ribeiro ALP, Ferlin EL, et al. Detecção de comprometimento vagal precoce isolado em pacientes chagásicos sem cardiopatia estudados pelo Mapa de Retorno Tridimensional. *Arq Bras Cardiol (resumo)*1997; 69(supl I): 87.)

151. Ribeiro ALP, Moraes RS, Ferlin EL, Silva M, Ribeiro JP, Rocha MOC. Increased heart rate variability in Chagas cardiomyopathy. *ANE (resumo)*1998; 3(supl): 51.
152. Murasato Y, Hirakawa H, Harada Y, Nakamura T, Hayashida Y. Effects of systemic hypoxia on R-R interval and blood pressure variabilities in conscious rats. *Am J Physiol* 1998; 275: 797-804.
153. Lacchini S, Ferlin E, Moraes R, Ribeiro JP, Irigoyen MC. Effect of NO on blood pressure and heart rate variability in sodium overloaded rats. *Hypertension (resumo)*1999; 33: 1292.
154. Parati G, Castiglioni P, Di Rienzo M, Omboni S, Pedotti A, Mancia G. Sequential spectral analysis of 24-hour blood pressure and pulse interval in humans. *Hypertension* 1990; 16: 414-421.
155. Lal SKL, Henderson RJ, Cejnar M, Hart MG, Hunyor SN. Physiological influences on continuous finger and simultaneous intra-arterial blood pressure. *Hypertension* 1995; 26: 307-314.