

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

THAIS MARQUES DA SILVA

**Fragmentação da frequência cardíaca em diferentes modelos
fisiopatológicos**

RIBEIRÃO PRETO - SP
2022

THAIS MARQUES DA SILVA

**Fragmentação da frequência cardíaca em diferentes modelos
fisiopatológicos**

Versão corrigida

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Jr.

Co-Orientador: Dr. Luiz Eduardo Virgílio da Silva

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Thais Marques

Fragmentação da frequência cardíaca em diferentes modelos fisiopatológicos. Ribeirão Preto, 2022.

113 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Fazan Junior, Rubens.

1. Variabilidade da frequência cardíaca. 2. Fragmentação da frequência cardíaca. 3. Doença cardiovascular. 4. Modelos experimentais de doenças. 5. Sistema nervoso autônomo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thais Marques da Silva

Fragmentação da frequência cardíaca em diferentes modelos fisiopatológicos

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em: 13 de janeiro de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Rubens Fazan Júnior

Instituição: FMRP - USP

Julgamento: Não votante

Prof. Dr.: Valdo José Dias da Silva

Instituição: UFTM

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.(a): Aparecida Maria Catai

Instituição: UFSCar

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.(a): Madalena Costa

Instituição: HMS

Julgamento: Aprovada

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes entidades e instituições.

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Bolsa de Doutorado: Agosto/2018 - Julho/2022, processo: 142489/2018-2.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2013/20549-7; 2020/06043-7.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*A Deus por permitir a realização desta importante etapa.
A minha mãe por toda dedicação, apoio e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha mãe, Valéria, que sempre acreditou em mim e fez dos meus sonhos os seus. Minha eterna gratidão, essa conquista também é sua. E também a minha irmã, Karen, por todo apoio, amor e palavras de incentivo.

Ao meu noivo, Pietro, que esteve comigo desde o início dessa jornada. Gratidão por todo apoio, por sonhar junto comigo e por nunca me deixar desistir. Você fez essa caminhada ser mais leve.

Aos meus queridos amigos do departamento de fisiologia, em especial Bia, Daniel, Henrique, Vivi, Nikolas, Claudinha, amigos com quem dividi a temida fase do cursão e com quem pude compartilhar conquistas e frustrações. Vocês foram minha família em Ribeirão Preto.

Aos amigos de laboratório, Amanda, Tereza, Rafael, Aline, Ana Omoto, Jaci, gratidão por toda troca, apoio, amizade e carinho. Meus dias foram mais alegres por ter vocês.

Ao meu co-orientador Dr. Luiz Eduardo, pessoa fundamental para a realização deste trabalho, por ouvir meus infundáveis questionamentos e ajudar com muito carinho e paciência, gratidão sem fim.

Ao professor Hélio Salgado, agradeço por toda ajuda, apoio e conselhos.

A professora Lucila, avaliadora dos meus relatórios anuais, agradeço pelos conselhos no decorrer desses quatro anos de doutorado e, principalmente, por todo apoio durante o período de pandemia.

Ao querido Beto que não mediu esforços para ajudar na realização dos protocolos experimentais do meu trabalho, sempre com paciência e muito amor pelo o que faz. Minha eterna gratidão.

Aos funcionários da secretaria do departamento de fisiologia, em especial à Cláudia, sempre pronta para ajudar e esclarecer questões burocráticas.

Em especial e com muito carinho agradeço ao meu orientador, professor Rubens Fazan, que me aceitou como sua aluna, acreditou em mim e conduziu esse trabalho com tanto carinho e dedicação. Minha eterna gratidão.

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

SILVA, T.M. **Fragmentação da frequência cardíaca em diferentes modelos fisiopatológicos.** Ribeirão Preto, 2022. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

Embora as variações rápidas da frequência cardíaca (FC) sejam comumente atribuídas à modulação vagal cardíaca, um padrão de variação ultrarrápido da FC tem sido recentemente estudado. Foi demonstrado que este tipo de variação, batizado de fragmentação da frequência cardíaca (HRF), está aumentado no envelhecimento e em doenças cardiovasculares. Assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar a influência do controle autonômico cardiovascular (simpático e vagal) na HRF; 2) avaliar o perfil da HRF em modelos experimentais de doenças que afetam o sistema nervoso autônomo e o coração, como diabetes melito (DM) agudo ou crônico, hipertensão arterial (ratos espontaneamente hipertensos - SHR, ou com hipertensão renovascular do tipo 1 rim 1 clipe - 1R1C ou 2 rins 1 clipe - 2R1C) e insuficiência cardíaca (4 ou 12 semanas após infarto do miocárdio - IM); e 3) investigar a correlação entre HRF e índices clássicos da variabilidade da frequência cardíaca (HRV). Registros diretos da pressão arterial ou eletrocardiograma foram realizados em ratos acordados para análise da HRF. Nossos achados mostram que o controle autonômico cardíaco parassimpático desempenha um papel importante na gênese da HRF em animais saudáveis. Em modelos experimentais que sabidamente apresentam disfunção autonômica, mostramos que a HRF não se altera (SHR e 1R1C) ou está diminuída (2R1C) em ratos hipertensos. Ratos com DM agudo ou crônico apresentam um aumento na HRF, sendo este mais acentuado em animais com DM crônico. Além disso, os índices de HRF estão aumentados em ratos 12 semanas após o IM, mas não em ratos 4 semanas após IM. Interessante notar que a HRF foi o único índice da HRV alterado em ratos com IM. Mostramos também que apesar das correlações existentes entre os índices de HRF e HRV, é razoável considerar que a HRF fornece informações complementares aos índices comumente utilizados para estudar a HRV. Em conjunto, os resultados indicam que a HRF é afetada tanto por mecanismos de

curto (DM) como longo prazo (IM), e que a hiperativação simpática, bem como níveis pressóricos elevados, por si só, não parece influenciar os padrões de HRF. Apesar de os mecanismos que dão origem à HRF ainda serem desconhecidos, os resultados aqui apresentados sugerem que a HRF seja resultado de uma combinação complexa de influências autonômicas/humorais no coração e das oscilações nos mecanismos celulares envolvidos na geração e condução dos potenciais de ação cardíacos. E ainda que mais estudos sejam necessários para desvendar os mecanismos por trás da HRF, é certo que esta nova forma de avaliar a dinâmica da FC é promissora como índice de risco cardiovascular. Finalmente, embora existam semelhanças entre o rato e o organismo humano, mais estudos são necessários para investigar se esses achados são aplicáveis a humanos.

Palavras-chave: Variabilidade da frequência cardíaca, fragmentação da frequência cardíaca, doença cardiovascular, modelos experimentais de doenças, sistema nervoso autonômico.

ABSTRACT

SILVA, T.M. **Heart rate fragmentation in different pathophysiological models.** Ribeirão Preto, 2022. PhD thesis. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2022.

Although rapid heart rate (HR) variations are commonly attributed to cardiac vagal modulation, an ultra-rapid HR variation pattern has recently been studied. This type of variation, called heart rate fragmentation (HRF), has been shown to increase in aging and cardiovascular disease. Thus, the objectives of the present study were (1) to evaluate the influence of cardiovascular autonomic control (sympathetic and vagal) on HRF; (2) to evaluate the HRF profile in experimental models of diseases that affect the autonomic nervous system and the heart, such as acute or chronic diabetes mellitus (DM), arterial hypertension (spontaneously hypertensive rats - SHR, or rats with renovascular hypertension type 1 kidney 1 clip - 1K1C and 2 kidneys 1 clip - 2K1C) and heart failure (4 and 12 weeks after myocardial infarction - MI); and (3) to investigate the correlation between HRF and classical heart rate variability indices (HRV). Direct recordings of blood pressure or electrocardiogram were performed in awake rats for HRF analysis. Our findings show that parasympathetic cardiac autonomic control plays an essential role in the genesis of HRF in healthy animals. In experimental models known to have autonomic dysfunction, we have shown that HRF does not change (SHR and 1K1C) or is reduced (2K1C) in hypertensive rats. Rats with acute or chronic DM show an increase in HRF, which is more pronounced in animals with chronic DM. Furthermore, HRF indices are increased in rats 12 weeks after IM but not in rats 4 weeks after IM. It is interesting to note that the HRF was the only altered HRV index in rats with MI. We also show that despite the existing correlations between the HRF and HRV indices, it is reasonable to consider that the HRF provides complementary information to the indices commonly used to study the HRV. Taken together, the results indicate that HRF is affected by both short-term (DM) and long-term (MI) mechanisms and that sympathetic hyperactivation and high blood pressure levels alone do not seem to influence patterns of HRF. Although the mechanisms that give rise to HRF are still unknown, the results presented here suggest that HRF results from a complex

combination of autonomic/humoral influences on the heart and oscillations in the cellular mechanisms involved in the generation and conduction of cardiac action potentials. Furthermore, even though more studies are needed to unravel the mechanisms behind HRF, this new way of assessing HR dynamics is certainly promising as an index of cardiovascular risk. Finally, although there are similarities between the mouse and the human organism, further studies are needed to investigate whether these findings apply to humans.

Key words: Heart rate variability, heart rate fragmentation, cardiovascular disease, experimental models of diseases, autonomic nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática dos mecanismos intracelulares de controle autônomo da função do nó sinusal.

Figura 2: Séries de intervalo cardíaco (NN) de um paciente com ritmo sinusal normal (acima) e de um paciente com ritmo excessivamente fragmentado (abaixo).

Figura 3: Representação gráfica da raiz quadrada da média do quadrado de sucessivas diferenças (RMSSD) e a porcentagem de pontos de inflexão (PIP, representando a HRF) de séries de intervalo cardíaco em indivíduos em faixas etárias distintas.

Figura 4: Captura de tela da correção dos artefatos no programa computacional PyBioS.

Figura 5: Ilustração do processo de conversão de uma série de intervalos cardíacos em uma série de símbolos.

Figura 6: Exemplo de contagem de padrões para o cálculo da entropia amostral.

Figura 7: Ilustração da construção de séries em diferentes escalas para a entropia multiescala.

Figura 8: Ilustração do cálculo dos padrões de fragmentação da frequência cardíaca (HRF).

Figura 9: Protocolo experimental do bloqueio autônomo seletivo e bloqueio autônomo combinado em ratos saudáveis.

Figura 10: Séries representativas de valores de intervalo RR em condição basal, bloqueio vagal, simpático ou bloqueio combinado.

Figura 11A: Fragmentação da frequência cardíaca em condição basal, bloqueio vagal, simpático ou bloqueio combinado em ratos da linhagem Sprague Dawley.

Figura 11B: Fragmentação da frequência cardíaca em condição basal, bloqueio vagal, simpático ou bloqueio combinado em ratos Wistar Kyoto.

Figura 12: Fragmentação da frequência cardíaca em SHR e seus respectivos controles normotensos WKY.

Figura 13: Fragmentação da frequência cardíaca em ratos hipertensos tipo 1R1C e 2R1C.

Figura 14: Fragmentação da frequência cardíaca em animais com diabetes melito agudo e crônico e seus respectivos controles normoglicêmicos.

Figura 15: A função sistólica avaliada 4 ou 12 semanas após IM ou cirurgia fictícia.

Figura 16: Fragmentação da frequência cardíaca em animais 4 e 12 semanas após o infarto do miocárdio e seus respectivos controles.

Figura 17: Gráficos de dispersão dos índices de HRF (PIP, W_1 , W^H e W^S) e parâmetros ecocardiográficos da função sistólica (LVEF).

Figura 18: Gráficos de dispersão dos índices de HRF (PIP, W_0 , W_3 e W^H) e índices tradicionais da HRV associados à modulação parassimpática cardíaca (RMSSD, HF e 2UV).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência cardíaca e índices de fragmentação da frequência cardíaca de ratos da linhagem Sprague Dawley e Wistar Kyoto em condição basal e durante o bloqueio seletivo e duplo dos receptores autonômicos cardíacos.

Tabela 2: Pressão arterial sistólica, média, diastólica e frequência cardíaca de ratos hipertensos SHR, 1R1C, 2R1C e os respectivos controles normotensos (WKY ou Controle).

Tabela 3: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos hipertensos SHR, 1R1C, 2R1C e os respectivos controles normotensos (WKY ou Controle).

Tabela 4: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos com diabetes agudo e crônico e seus respectivos controles normoglicêmicos.

Tabela 5: Pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca de ratos 4 e 12 semanas após infarto do miocárdio, ou ratos controle (SHAM).

Tabela 6: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos 4 e 12 semanas após o IM e seus respectivos controles.

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Spearman entre HRF e parâmetros ecocardiográficos de função sistólica (LVEF e LVFS).

Tabela 8: Coeficientes de correlação de Spearman entre HRF e índices tradicionais da HRV.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

DCV: Doença cardiovascular.

DFA: Análise de flutuações destendenciadas.

DM: Diabete Melito.

DM1: Diabete Melito tipo 1.

DM2: Diabete Melito tipo 2.

ECG: Eletrocardiograma.

FC: Frequência cardíaca.

HF: Potência do espectro na banda de alta frequência.

HRF: Heart rate fragmentation – Fragmentação da frequência cardíaca.

HRV: Heart rate variability – Variabilidade da frequência cardíaca.

IC: Insuficiência cardíaca.

IM: Infarto do miocárdio.

IP: Intervalo de pulso.

iRR: Intervalo entre as ondas R do eletrocardiograma.

LF: Potência do espectro na banda de baixa frequência.

LF/HF: Relação entre as potências nas bandas de LF e HF.

LVEF: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

LVFS: Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo.

PA: Pressão arterial.

RMSSD: Raiz quadrada média de diferenças sucessivas.

SampEn: Entropia amostral.

SD: Rato da linhagem Sprague Dawley

SDNN: Desvio padrão dos intervalos cardíacos normais.

SNA: Sistema nervoso autônomo.

STZ: Estreptozotocina.

PIP: Porcentagem de pontos de inflexão.

WKY: Wistar Kyoto.

W^H: Porcentagem de padrões com apenas pontos de inflexão do tipo *hard*.

W^M: Porcentagem de padrões com pontos de inflexão do tipo *mixed*.

W^S: Porcentagem de padrões com apenas pontos de inflexão do tipo *soft*.

W₀: Porcentagem de padrões com 0 pontos de inflexão.

W₁: Porcentagem de padrões com 1 pontos de inflexão.

W₂: Porcentagem de padrões com 2 pontos de inflexão.

W₃: Porcentagem de padrões com 3 pontos de inflexão.

1R1C: Um rim um clipe.

2R1C: Dois rins um clipe.

0V: Porcentagem de padrões sem variação.

1V: Porcentagem de padrões com uma variação.

2LV: Porcentagem de padrões com duas variações semelhantes.

2UV: Porcentagem de padrões com duas variações diferentes.

ÍNDICE

1. Introdução.....	20
1.1 Variabilidade da frequência cardíaca	23
1.2 Fragmentação da frequência cardíaca	27
2. Objetivo	31
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. Análise de Dados	33
3.1 Geração e correção de séries temporais (tacograma).....	34
3.2 Análise da variabilidade da frequência cardíaca.....	35
3.2.1 Índices lineares	35
3.2.2 Índices não lineares.....	36
3.3 Fragmentação da frequência cardíaca	41
4. Estudo 1	44
Atividade Autonômica & Fragmentação da Frequência Cardíaca	
4.1 Métodos	46
4.2 Resultados.....	50
4.3 Discussão	54
5. Estudo 2	57
Hipertensão Arterial & Fragmentação da Frequência Cardíaca	
5.1 Ratos espontaneamente hipertensos	59
5.2 Hipertensão de origem renovascular em ratos	60
5.3 Métodos	62
5.4 Resultados.....	65
5.5 Discussão	69
6. Estudo 3	72
Diabete Melito & Fragmentação da Frequência Cardíaca	
6.1 Métodos	75
6.2 Resultados.....	77
6.3 Discussão	80
7. Estudo 4	82
Infarto do Miocárdio & Fragmentação da Frequência Cardíaca	
7.1 Métodos	84
7.2 Resultados.....	87

7.3 Discussão	93
8. Correlação entre índices HRF e HRV	96
8.1 Métodos	97
8.2 Resultados.....	97
8.3 Discussão	100
9. Conclusão	102
10. Referências	104

1. Introdução

A homeostase, conceito usado para descrever a baixa variabilidade e estabilidade dinâmica do organismo, foi um princípio dominante na fisiologia por mais de meio século (Cannon, 1929). Entretanto, estudos mostraram a presença de uma variabilidade intrínseca em diversas variáveis fisiológicas em organismos saudáveis. A frequência cardíaca (FC), por exemplo, é resultado de um mecanismo complexo, que apresenta variação em função do tempo (Goldberger, 2012; Lipsitz, 1995).

De forma geral, uma característica importante dos sistemas fisiológicos é a sua grande complexidade. Ela surge da interação entre os diversos sistemas do organismo que interagem entre si em diferentes escalas espaciais (moléculas, células, tecidos, órgãos e sistemas) e temporais (milissegundos a dias) (Goldberger, Peng e Lipsitz, 2002; Silva, 2017). Essa interação indica que o comportamento de cada elemento é influenciado pelos outros elementos do sistema, ou seja, o comportamento global não pode ser explicado pelas partes separadas e sim pela interação entre elas (Silva, 2017).

A dinâmica complexa dos sistemas fisiológicos permite que o organismo reaja e se adapte de forma mais eficiente em momentos de estresse ou situações adversas, dando ao organismo mais opções para uma resposta eficaz, de forma que quanto mais complexo o sistema, maior a sua adaptabilidade (Kyriazis, 2003; Silva, 2017).

A saúde é um estado fisiológico e biológico complexo. Em indivíduos saudáveis as interações entre os sistemas e os mecanismos fisiológicos funcionam adequadamente, permitindo ao organismo responder adequadamente e retomar o estado fisiológico original após determinada lesão ou doença. Por exemplo, se houver o bloqueio de um ramo vascular, há uma propensão em retornar à complexidade da vascularização dessa área. Se a complexidade original for restaurada, o organismo estará saudável novamente. Essas reações adaptativas do organismo refletem sua complexidade (Kyriazis, 2003).

A complexidade é uma característica comum dos fenômenos naturais, e não uma característica apenas do corpo humano. Em uma árvore, por exemplo, se um galho é cortado, alterando sua forma geométrica, mecanismos internos são ativados para tentar retomar ao seu estado original (desenvolver um novo galho). Quando o organismo possui um nível de complexidade suficiente capaz

de responder a esses eventos adversos, o estado do organismo é considerado “saudável” (Kyriazis, 2003). Assim, se a complexidade está presente na natureza como um todo, significa que ela é importante e necessária para a manutenção da vida.

Processos de envelhecimento e condições patológicas estão associados a uma redução da complexidade dos sistemas fisiológicos, no qual o organismo perde a capacidade de responder de forma adequada a eventos adversos. A perda da complexidade gera restrições ao organismo como um todo, geralmente envolvendo a perda ou diminuição do acoplamento entre os componentes do organismo, diminuindo de forma considerável sua capacidade adaptativa (Kyriazis, 2003; Lipsitz, 1995).

Como mencionado anteriormente, os sistemas complexos possuem estruturas em diversas escalas. Por exemplo, a complexidade do organismo animal surge das interações entre os diferentes sistemas fisiológicos (sistema nervoso, digestório, motor, etc.); estes, por sua vez, também possuem sua complexidade intrínseca, gerada pelas interações entre as funções dos órgãos, tecidos e células.

De forma específica, o sistema cardiovascular tem um papel central no organismo, sendo responsável por entregar o sangue aos tecidos, fornecendo nutrientes essenciais às células para seu metabolismo e removendo os produtos metabólicos (Boron e Boulpaep, 2015). Além do seu papel causal, o sistema cardiovascular é sensível a diversos componentes, tornando-o capaz de responder (se adaptar) aos desafios que surgem o tempo todo, com mudanças metabólicas, hormonais, posturais. A pressão arterial (PA) sistêmica é a principal variável que o sistema cardiovascular controla, um parâmetro vital que reflete aspectos fundamentais de saúde e sobrevivência (Boron e Boulpaep, 2015). Mecanismos lentos (horas ou dias) e rápidos (segundos a minutos) contribuem para o controle da PA.

Apesar da importância dos diferentes mecanismos lentos de regulação da PA, é mais comum a avaliação da dinâmica do sistema cardiovascular no médio e curto prazo, sendo o sistema nervoso autônomo (SNA) um dos componentes mais importantes neste caso. A modulação autonômica cardíaca gera padrões complexos na dinâmica do sistema cardiovascular, em especial na dinâmica da FC, que podem ser avaliados através de ferramentas matemáticas. Assim, o

estudo da variabilidade da frequência cardíaca (HRV) é capaz de revelar informações preciosas sobre a regulação do sistema cardiovascular (e do organismo como um todo), sendo a forma mais comum de avaliar a complexidade fisiológica e condições de saúde ou doença (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996).

1.1 Variabilidade da frequência cardíaca

A HRV tem sido há muito tempo o termo convencionalmente aceito para descrever as variações existentes na FC, ou intervalo cardíaco, ao longo do tempo. O comportamento irregular dos batimentos cardíacos é notável quando a FC é examinada a cada batimento cardíaco, mas é ignorada quando um valor médio (sob vários batimentos cardíacos) é calculado (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). As flutuações da FC batimento a batimento carregam informações complementares ao valor médio de FC, representando uma valiosa ferramenta de estudo e um dos marcadores de modulação, especialmente neural, da atividade cronotrópica do coração, tanto em nível clínico como experimental.

As evidências de uma associação entre arritmias cardíacas graves e aumento da atividade simpática, e/ou redução da atividade vagal, incentivou o desenvolvimento de marcadores da atividade autonômica (Task Force, 1996). Nesse sentido, a HRV surge como um dos marcadores mais promissores da modulação autonômica cardíaca por seu uso fácil, seguro e reprodutível (Task Force, 1996). A relevância clínica da HRV foi vista pela primeira vez em 1965, quando foi observado que o sofrimento fetal era precedido pela redução da variabilidade entre intervalos cardíacos antes de qualquer alteração na FC propriamente dita (Task Force, 1996). A partir de então, outros estudos surgiram mostrando a importância de se avaliar índices da HRV. Entretanto, a importância clínica dessa ferramenta ganhou destaque apenas no final da década de 80, quando foi confirmado que a HRV era um preditor forte, e independente, de mortalidade após infarto do miocárdio (IM) (Task Force, 1996). E, atualmente, com a disponibilidade de modernos sistemas de registros eletrocardiográficos digitais de alta resolução, a HRV tem o potencial de fornecer informações valiosas sobre as condições fisiológicas e patológicas e assim melhorar a estratificação de risco dos pacientes (Task Force, 1996).

A modulação autonômica cardíaca tem sido associada como o principal causador HRV. Evidências mostram que um coração mal modulado possui baixa HRV, e que isto está correlacionado com maior risco cardíaco e mortalidade, pois reflete um comprometimento da capacidade adaptativa a respostas e desafios. Por exemplo, pacientes com baixa HRV demonstraram capacidade regulatória cardíaca reduzida e maior probabilidade de IM (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). O processo de envelhecimento também está associado a uma redução na HRV (Lipsitz, 1995) e também na complexidade da dinâmica fisiológica (Lipsitz e Goldberger, 1992; Takahashi *et al.*, 2012). Além disso uma alteração na HRV também é encontrada em pacientes hipertensos, os quais apresentam maiores valores de LF e menores osculações na banda de HF do espectro da HRV, em comparação com pacientes normotensos (Guzzetti *et al.*, 1988; Langewitz, Rüddel e Schächinger, 1994; Malliani *et al.*, 1991; Pagani e Lucini, 2001).

As variações na FC podem ser avaliadas por várias abordagens matemáticas, como os índices de análise no domínio do tempo e no domínio da frequência (Malliani *et al.*, 1991; Task Force, 1996), bem como por métodos que avaliam dinâmicas não lineares da HRV (Voss *et al.*, 2009). Os índices da HRV no domínio do tempo são os mais simples de calcular. São obtidos, geralmente, por métodos estatísticos ou geométricos e refletem todos os componentes responsáveis pela variabilidade no período de registro, sendo, portanto, uma estimativa global da HRV (Task Force, 1996). Os métodos estatísticos, cujo principal índice é o desvio padrão dos intervalos cardíacos "normais" (SDNN), guardam estreita relação com a modulação autonômica do coração e com risco de eventos cardíacos graves em diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas (Malliani *et al.*, 1991; Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996).

Outro índice de HRV no domínio do tempo é a raiz quadrada da média do quadrado de diferenças entre intervalos cardíacos sucessivos (RMSSD) (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996). Ele reflete a variação do intervalo cardíaco entre batimentos sucessivos, sendo uma medida mais associada à modulação vagal cardíaca (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). Isso porque o parassimpático é capaz de promover alterações rápidas na FC, de um batimento para outro, pois a ligação da acetilcolina aos receptores muscarínicos

leva à abertura direta de canais para potássio, sem depender da ação de segundos mensageiros, **Figura 1**. O simpático, por outro lado, depende da ação de segundo mensageiros nas células de cardiomiócitos para que sua ação ocorra, o que leva mais tempo (Stauss, 2006).

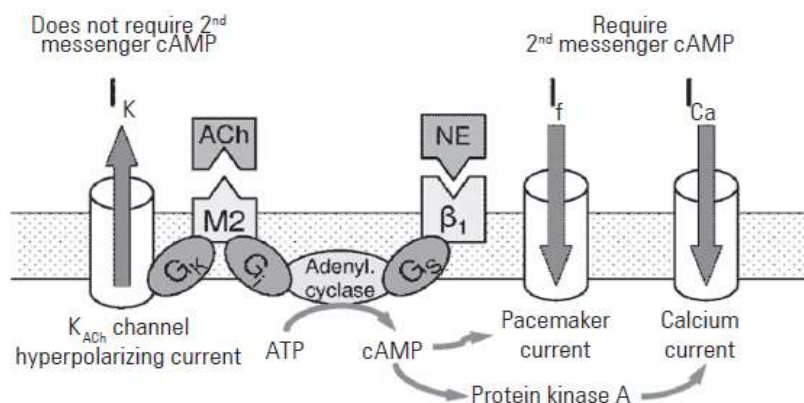


Figura 1: Ilustração esquemática dos mecanismos intracelulares de controle autonômico da função do nó sinusal. A liberação de acetilcolina (ACh) pelos neurônios pós-ganglionares parassimpáticos ativa receptores muscarínicos do tipo 2 (M₂) nos cardiomiócitos. O receptor M₂ está acoplado a um canal para potássio através de uma proteína G_k, e quando ativado por ACh, causa a abertura direta destes canais. Por outro lado, a liberação de noradrenalina (NE) pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos ativa receptores adrenérgicos β₁ nos cardiomiócitos. O receptor β₁ promove a abertura de canais despolarizantes através de uma cascata intracelular de sinalização dependente de segundo mensageiros como o AMP cíclico (Stauss, 2006).

Apesar dos índices de HRV no domínio do tempo serem valiosos no estudo da função autonômica cardíaca, eles não permitem quantificar adequadamente a dinâmica autonômica ou determinar a atividade rítmica gerada pelas diferentes divisões simpática e parassimpática da atividade cardíaca (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996). O estudo da HRV no domínio da frequência permite a identificação e quantificação de oscilações rítmicas do intervalo cardíaco em diversas frequências, às quais refletem a modulação simpática e parassimpática sobre o coração, em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Malliani *et al.*, 1991; Task Force, 1996). O espectro da HRV é,

em geral, quantificado em três diferentes bandas de frequência. Fatores humorais, como óxido nítrico, peptídeo natriurético atrial, catecolaminas da adrenal e o sistema renina-angiotensina, participam da gênese dos ritmos muito lentos, ou de muito baixa frequência (VLF: $<0,05$ Hz), da HRV (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Stauss, 2003; Task Force, 1996). Já as oscilações de baixa frequência (LF: 0,05 a 0,15 Hz) da FC estão associadas, principalmente, mas não exclusivamente, à modulação simpática sobre o coração enquanto aquelas de alta frequência (HF: 0,15 a 0,5 Hz) correspondem mais diretamente à modulação vagal cardíaca, ocorrendo na mesma frequência da respiração, sendo, por isso conhecida como arritmia sinusal respiratória (Malliani *et al.*, 1991; Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). A arritmia sinusal respiratória acontece devido ao acoplamento entre a atividade neural da respiração e eferências cardíacas vagais. Por exemplo, a taquicardia observada durante a inspiração é devida à inibição de neurônios vagais, ocasionada pela atividade de neurônios motores inspiratórios que se projetam para núcleos vagais (Machado, Zoccal e Moraes, 2017).

Os métodos de análise da HRV no domínio do tempo e da frequência são muito utilizados pois possuem indicativos sobre a modulação simpática e vagal do coração (Malliani *et al.*, 1991; Montano *et al.*, 1994). Porém estudos mostram que métodos que avaliam características não lineares da FC, como complexidade, autossimilaridade, bem com padrões específicos na dinâmica da FC, também possuem uma enorme relevância (Silva, 2017). Destacamos três abordagens não lineares bastante utilizadas para estudo da HRV: métodos que quantificam a entropia, análise de flutuações destendenciadas (DFA), e análise de dinâmica simbólica (Porta, Tobaldini, *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2009).

A entropia, de forma geral, é uma medida que quantifica a irregularidade ou imprevisibilidade de uma série temporal (Cerutti *et al.*, 2014; Goldberger, Peng e Lipsitz, 2002; Silva, 2017). A presença de padrões repetitivos torna a série temporal previsível, de forma que uma série que apresenta muitos padrões repetitivos ao longo do tempo é caracterizada como regular ou previsível (entropia baixa). Por outro lado, séries que possuem poucos padrões repetitivos são naturalmente menos previsíveis e sua entropia é mais elevada (Cerutti *et al.*, 2014; Goldberger, Peng e Lipsitz, 2002; Silva, 2017).

A DFA é uma ferramenta matemática que quantifica características de autossimilaridade de uma série temporal. Como o conceito de autossimilaridade está intimamente ligado com o conceito de fractais, a DFA é comumente atribuída como uma medida fractal para séries temporais (Peng *et al.*, 1995). O cálculo da DFA consiste em identificar a relação existente entre as flutuações (destendenciadas) e sua escala temporal. Em geral, uma relação de 1 para 1 entre as flutuações e a escala temporal (expoente de escala 1) são observadas em séries HRV de indivíduos saudáveis (Silva, 2017).

Por fim, os métodos de análise simbólica propõem a simbolização dos valores de uma série de intervalo cardíaco com posterior avaliação da dinâmica destes símbolos. A simbolização dos valores originais de intervalo cardíaco, por si só, representa uma transformação não linear que caracteriza estes métodos dentro do grupo de medidas não lineares. Existem diversas abordagens para simbolização e análise dos padrões de símbolos, a maioria intimamente relacionada com a modulação simpática e parassimpática do coração (Porta, Tobaldini, *et al.*, 2007). Sua vantagem em relação a métodos clássicos, como a análise espectral, está em não considerar a série de HRV como resultado de um sistema linear.

A HRV é um assunto dinâmico e novos métodos de análise surgem com o passar do tempo. Mas, apesar dos vários métodos existentes, estudos mostraram que nenhum deles é capaz de descrever, sozinho, as características do sistema cardiovascular, o que mostra a importância de analisar a HRV por diferentes técnicas (Silva, 2017; Voss *et al.*, 2009).

1.2 Fragmentação da frequência cardíaca

Embora as variações rápidas da FC sejam comumente atribuídas à modulação vagal cardíaca, padrões de variação ultrarrápido da FC tem sido observado. Em 2002, Stein e colaboradores já haviam observado esse tipo de flutuação da FC, aparentemente de origem aleatória, dando o nome de variações “erráticas” a esse fenômeno (Stein *et al.*, 2002). Apesar da observação deste tipo de padrão datar mais de 20 anos, foi apenas recentemente que maior atenção foi dada a ele. Em 2017, Costa e colaboradores (Costa, Davis e Goldberger, 2017a) comparam esse tipo de flutuações erráticas da FC em uma população de indivíduos saudáveis e indivíduos com doença arterial coronariana, percebendo

o seu potencial valor como marcador de risco cardíaco, e dando um novo nome ao fenômeno, fragmentação da frequência cardíaca (HRF). Estudos posteriores notaram que várias condições patológicas podem ocasionar flutuações de FC em ritmos mais rápidos que a respiração, não consistentes com o controle parassimpático cardíaco (Costa *et al.*, 2018; Costa, Davis e Goldberger, 2017a; Yuda *et al.*, 2020). Assim, o aumento desses padrões de variação ultrarrápidos da FC foi considerado anormal, **Figura 2**.

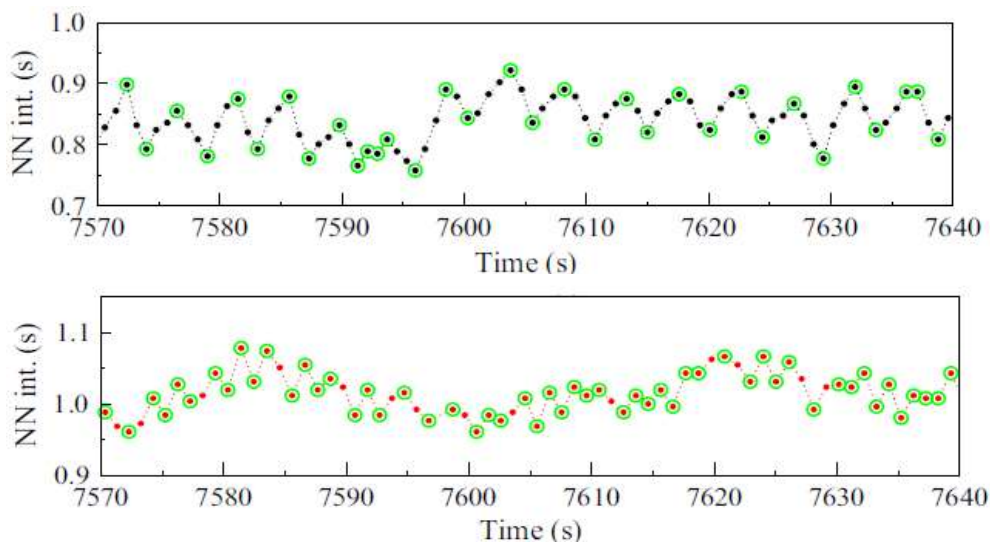


Figura 2: Séries de intervalos cardíacos normais (NN int.) de um paciente com ritmo sinusal normal (acima) e de outro com ritmo excessivamente fragmentado (abaixo). Note que o traçado classificado como fragmentado possui um maior número de pontos de inflexão da frequência cardíaca (mudança na direção da FC, destacadas pelos círculos verdes) do que aquele com padrão normal, sendo o padrão normal considerado mais “fluente” ou menos “fragmentado” (Costa *et al.*, 2018).

A HRF parece ser um novo e promissor biomarcador de predição de risco e morte cardiovascular. O aumento da HRF também foi observado no envelhecimento, estando fortemente associado ao maior risco de eventos cardiovasculares adversos (Costa *et al.*, 2018; Costa, Davis e Goldberger, 2017b). Mais recentemente foi demonstrado que a HRF se correlaciona positivamente com índices clínicos importantes de risco cardiovascular, como o de *Framingham* e o MESA (estudo multiétnico da aterosclerose) (Costa *et al.*, 2018). Além disso Costa e colaboradores também demonstraram que a HRF agrega valor aos preditores de fibrilação atrial como: calcificação coronariana,

concentrações séricas de peptídeo natriurético tipo B do pró-hormônio NH2-terminal (NT-proBNP) e extrassístoles. Também foi visto que as medidas tradicionais da HRV não foram associadas à fibrilação atrial nesse estudo (Costa *et al.*, 2021). Este mesmo grupo demonstrou uma associação independente de uma combinação de fatores de risco, amplamente reconhecidos, entre o aumento da HRF e o comprometimento cognitivo e demência em pacientes do MESA (Costa *et al.*, 2021).

Uma das características fundamentais da HRF está na separação dos componentes oscilatórios rápidos da FC (associados ao parassimpático) dos ultrarrápidos (a princípio, além da frequência atribuída ao parassimpático). Acredita-se que estas oscilações ultrarrápidas sejam resultado de um fenômeno mais complexo, que em geral diminui em situações de perda de complexidade fisiológica, como doenças cardiovasculares (DCV) e envelhecimento. Sabe-se, por exemplo, que a modulação vagal diminui com o envelhecimento; no entanto, há relatos de aumento de índices de HRV comumente associados à modulação vagal (como o RMSSD) em indivíduos com mais de 65 anos, **Figura 3** (Costa *et al.*, 2018; Hayano *et al.*, 2020). Em contrapartida, os padrões de HRF crescem de forma consistente com o avanço da idade, indicando as limitações das medidas clássicas de HRV como marcadores da modulação autonômica e a importância da HRF como biomarcador de complexidade do sistema cardiovascular.

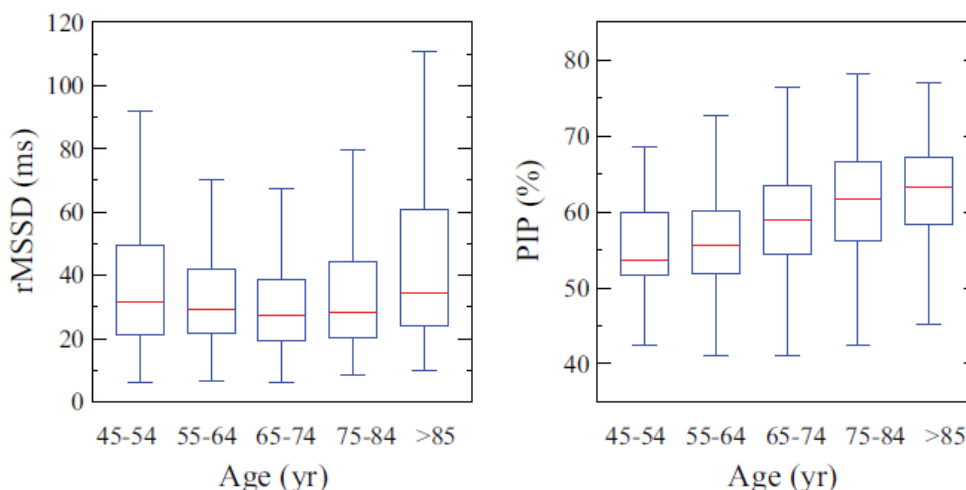


Figura 3: Representação gráfica da raiz quadrada da média do quadrado de sucessivas diferenças (RMSSD) e a porcentagem de pontos de inflexão (PIP, representando a HRF) de séries de intervalo cardíaco em indivíduos em faixas

etárias distintas O Aumento da RMSSD observado após os 65 anos é inconsistente com a queda na modulação vagal do coração que ocorre no envelhecimento. Em contrapartida, o PIP aumenta monotonicamente com a idade (Costa *et al.*, 2018).

Apesar de ser um método promissor, os mecanismos que levam à HRF não são bem conhecidos. Alguns autores sugerem que o aumento do ritmo fragmentado pode ser devido a problemas de geração e condução do potencial de ação cardíaco (Lensen *et al.*, 2020), como consequência de processos inflamatórios, degeneração, fibrose ou calcificação no nodo sino-atrial, além da disfunção dos barorreceptores e/ou hiperatividade simpática (Costa *et al.*, 2018). Contudo, nenhuma dessas hipóteses foi sistematicamente testada e mais estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos que levam à HRF.

Nesse contexto, em busca da compreensão dos possíveis mecanismos que geram um ritmo fragmentado na FC, o presente estudo investigou como se comporta o padrão de HRF em modelos experimentais (no rato) de DCV ou doenças sistêmicas que afetam o controle autonômico e/ou do coração.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a HRF em modelos experimentais de doenças no rato, bem como nos seus respectivos controles saudáveis, correlacionado seus índices com aqueles comumente usados em estudos de HRV. Também foi nosso objetivo avaliar a influência do controle autonômico cardiovascular (simpático e vagal) nos índices de HRF.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Correlacionar os índices da HRF com os índices comumente usados em estudos da HRV.

2.2.2 Investigar a influência do sistema nervoso autônomo na HRF, por meio da administração de bloqueadores farmacológicos de receptores autonômicos seletivos.

2.2.3 Investigar as alterações da HRF em ratos com diabetes melito agudo ou crônico.

2.2.4 Investigar as alterações da HRF em ratos hipertensos (ratos espontaneamente hipertensos ou com hipertensão renovascular).

2.2.5 Investigar as alterações da HRF em ratos com insuficiência cardíaca induzida pelo IM (4 ou 12 semanas após o IM).

3. Análise de Dados

Para que nossos objetivos fossem atingidos, esse estudo consistiu na realização de diversos protocolos experimentais em ratos, bem como na análise retrospectiva de registros cardiovasculares, também em ratos, obtidos de estudos anteriores do laboratório. Essa seção descreverá, em detalhes, toda a metodologia utilizada, tanto nos experimentos realizados exclusivamente para esse estudo, como aquelas aplicadas em dados obtidos de estudos prévios.

Uma vez que a análise da HRV, em especial a análise da HRF, foi aplicada em todos os protocolos experimentais, iniciaremos a descrição metodológica pelos protocolos de geração e análise de séries temporais de intervalos cardíacos (ou intervalos de pulso, IP).

3.1 Geração e correção de séries temporais (tacograma)

Eletrocardiogramas (ECG), ou registros diretos de PA, foram analisados usando os módulos de análise de ECG ou *Blood Pressure*, respectivamente, do programa computacional LabChart (ADInstruments, Dunedin, Austrália) para geração de tacogramas. O processo de detecção automática das ondas R do ECG, ou dos valores de PA sistólica, foi acompanhado visualmente e séries temporais, batimento-a-batimento, de intervalo cardíaco (intervalo entre as ondas R do ECG, iRR) ou IP, entre sucessivos valores de PA sistólica, foram geradas (Silva *et al.*, 2017). Períodos com o mínimo de transientes foram selecionados e passaram por um processo de correção de batimentos prematuros, erros de detecção ou outros transientes, usando o programa computacional PyBioS, desenvolvido em nosso laboratório (Silva, Fazan e Marin-Neto, 2020). Este processo consiste em, primeiramente, calcular a linha de base das séries através de uma mediana móvel (tamanho definido pelo usuário). Na sequência, a linha de base é deslocada para cima e para baixo em uma porcentagem (definida pelo usuário) do valor médio da linha de base, formando os limiares superior e inferior de tolerância para valores normais. Então, valores das séries acima do limiar superior ou abaixo do limiar inferior foram marcados como artefatos e corrigidos por interpolação linear, **Figura 4**. Séries onde as remoções excederam 3% do número total de valores não foram utilizadas no estudo (Silva *et al.*, 2017).

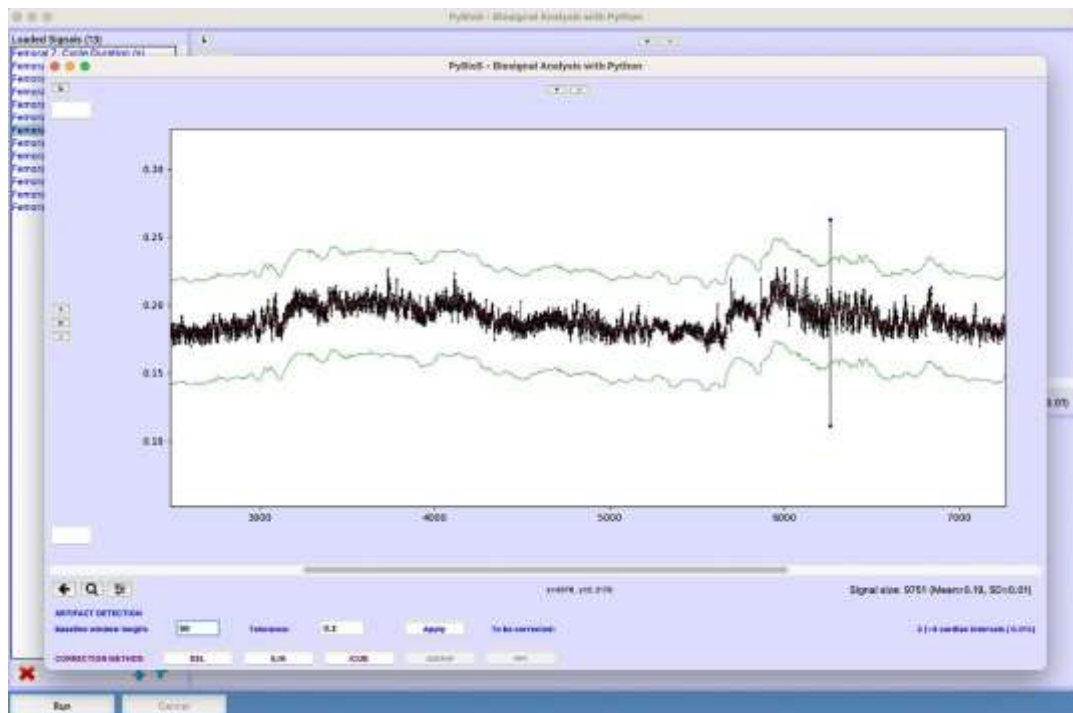


Figura 4: Captura de tela da correção dos artefatos no programa computacional PyBioS. O gráfico mostra o sinal original (em preto), a curva da linha de base (em vermelho) e os dois limiares de tolerância (em verde). Os pontos da série original qualificados para correção são destacados em azul.

3.2 Análise da variabilidade da frequência cardíaca

Índices lineares e não lineares da HRV amplamente utilizados, como índices no domínio de tempo, domínio de frequência, dinâmica simbólica, DFA e entropia amostral (SampEn), foram calculados a partir de séries corrigidas de iRR, ou IP. Todas as análises de HRV foram realizadas por meio do programa computacional PyBios, mencionado anteriormente.

3.2.1 Índices lineares

Domínio do tempo

Os índices da HRV no domínio do domínio do tempo são os mais simples de calcular e consistem no SDNN e RMSSD dos tacogramas. Para o cálculo desses índices, as séries foram segmentadas a cada 1500 valores, com sobreposição de 50%, e a mediana dos índices obtidos em cada segmento foi considerada para cada rato.

Domínio da frequência (análise espectral)

Para análise espectral, os tacogramas foram reamostradas em 10 Hz por interpolação cúbica (*spline*) e divididos em segmentos de 512 valores com sobreposição de 50%, segundo o protocolo de Welch (Welch, 1967). Os seguimentos foram então submetidos a análise espectral pela transformada rápida de Fourier e os espectros integrados em bandas de baixa (LF: 0,2 a 0,8 Hz) e alta frequência (HF: 0,8 a 3 Hz). A mediana dos valores das potências dos espectros nas referidas bandas, em unidades absolutas (ms^2) ou relativas, foram consideradas para cada rato. A relação LF/HF também foi calculada como um índice de balanço simpátovagal cardíaco (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996).

3.2.2 Índices não lineares

Dinâmica simbólica

Os métodos de análise da dinâmica simbólica são baseados na transformação dos valores das séries temporais em uma sequência de símbolos, e posteriormente, a análise de pequenos padrões de símbolos. No presente estudo utilizamos o método proposto por Porta e colaboradores (Porta, Tobaldini, *et al.*, 2007). Inicialmente, as séries iRR, ou IP, foram divididas em segmentos de 500 valores, com sobreposição de 50%, e a faixa de valores (max-min) de cada segmento foi dividida em 6 níveis iguais. Então, a cada valor iRR, ou IP, foi atribuído um símbolo (de 0 a 5) de acordo com a faixa em que cada valor estava localizado. Em seguida, sequências de 3 símbolos consecutivos foram classificadas de acordo com o padrão de variação, sendo eles: 0V, quando os três pontos consecutivos estão dentro da mesma faixa, não ocorrendo variação. As sequências {0,0,0} e {4,4,4} são exemplos de sequências dessa família; 1V, quando dois símbolos consecutivos são iguais e um é diferente, ocorrendo uma variação. Exemplos de sequências dessa família são {4,2,2} e {0,0,3}; 2LV, quando ocorrem duas variações em direções semelhantes (ascendentes ou descendentes) entre símbolos. Exemplos de sequências dessa família são {0,1,5} e {4,3,2}; e 2UV, quando ocorrem duas variações em direções diferentes, na qual todos os três símbolos estão organizados em forma de pico ou vale. As sequências {1,5,1} e {2,1,4} são exemplos de sequências dessa família. A

porcentagem de ocorrência de padrões dentro de cada família foi estimada para cada segmento, e os valores médios dos segmentos foram usados para representar cada rato. Esses valores permitem identificar os tipos de oscilações predominantes na série estudada. O grande valor da análise simbólica como ferramenta de avaliação da HRV foi demonstrado pela forte correlação entre a taxa de incidência das famílias 0V e 2UV e a modulação autonômica simpática e parassimpática, respectivamente (Guzzetti *et al.*, 2005; Porta, Tobaldini, *et al.*, 2007). A **Figura 5** mostra o esquema representativo da análise simbólica.

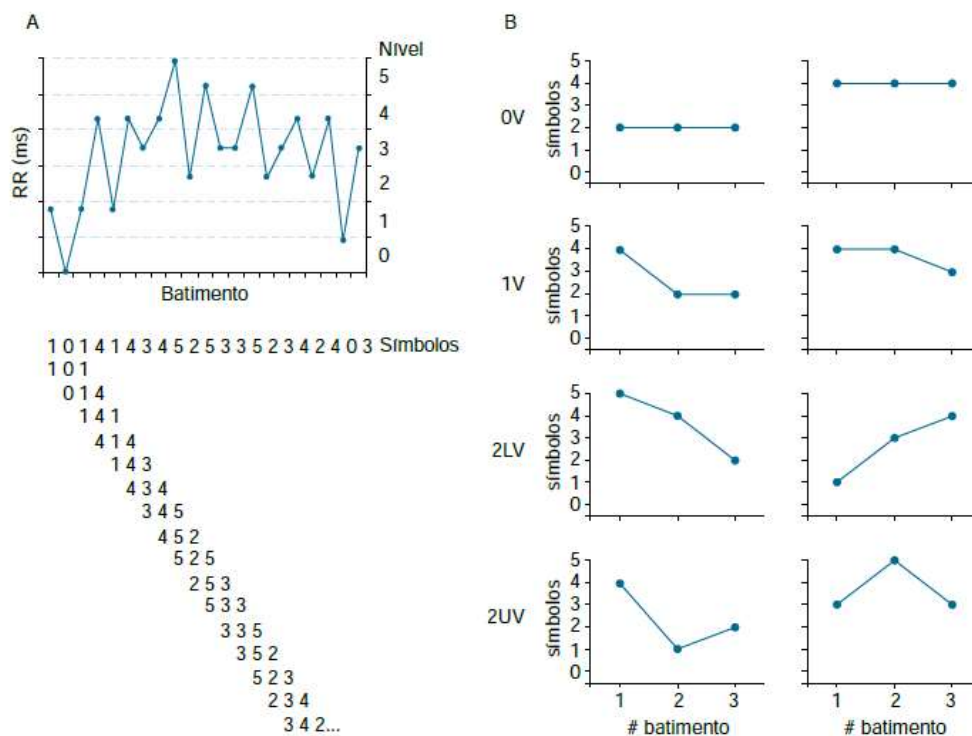


Figura 5: Ilustração do cálculo da análise simbólica. A faixa total de valores de intervalo cardíaco foi dividida em seis níveis iguais, cada qual associado a um símbolo de 0 a 5 (A). Em seguida, cada sequência de três símbolos é classificada em uma das quatro famílias de padrões, ou seja, padrões sem variações (0V), padrões com 1 variação (1V), padrões com 2 variações semelhantes (2LV) e padrões com 2 variações diferentes (2UV) (B) (Guzzetti *et al.*, 2005; Porta, Tobaldini, *et al.*, 2007; Silva, 2017).

DFA (Análise de Flutuações Destendenciadas)

A DFA quantifica o grau de autossimilaridade presente em sinais ou séries temporais, estando intimamente relacionada com a ideia dos fractais. Fractais são estruturas que se repetem, no tempo ou no espaço, apresentando

propriedades similares as da estrutura original em qualquer escala considerada (Ivanov *et al.*, 1999). A DFA baseia-se na avaliação do grau de autossimilaridade das flutuações em diferentes janelas temporais, identificando o expoente de escala que melhor caracteriza a relação entre as flutuações e a escala de tempo (Silva, 2017). Em geral, as flutuações da FC são caracterizadas por uma correlação do tipo lei de potência. Isso é refletido como uma estrutura fractal no tempo, onde oscilações lentas tendem a ocorrer com maior amplitude do que oscilações rápidas (Silva, 2017).

Como as séries iRR, ou IP, possuem flutuações naturalmente limitadas (a FC nunca excede será 500 bpm, por exemplo), o cálculo da DFA requer um mapeamento da série iRR, ou IP, original para uma representação ilimitada em amplitude, de forma a identificar as propriedades de autossimilaridade. Para isso, remove-se o valor médio da série iRR, ou IP, de todos os seus valores e acumula-se os valores originais, de modo que cada elemento da série mapeada representa a soma de todos os valores anteriores. Em seguida, a série mapeada é dividida em janelas de tamanho “n”, sem sobreposição, onde, em cada uma, calcula-se e subtrai-se a reta de tendência dos valores, gerando séries acumuladas destendenciadas. Na sequência, todas as janelas são concatenadas e calcula-se a raiz quadrática média da série completa, representando as flutuações destendenciadas para janelas de tamanho “n”. Esse processo é repetido para diversos tamanhos de janela (“n”) e cria-se um gráfico log-log entre as flutuações (eixo Y) para cada tamanho de janela (eixo X). A inclinação da reta que melhor ajusta os pontos deste gráfico representa a relações de escala entre as flutuações e a escala de tempo (Silva, 2017). É possível ajustar uma, duas, ou mais retas aos pontos deste gráfico, analisando faixas de escala específica de interesse. Por caracterizar a relação de escala entre as flutuações e o tempo, estes expoentes são normalmente entendidos como índices fractais (Silva, 2017).

No presente estudo, os coeficientes de escala da DFA foram estimados em três escala temporais distintas (“n”): de 5 a 15 (α_1), de 30 a 100 (α_2) e de 100 a 1100 (α_3) valores de séries temporais. Esses índices podem ser interpretados como o expoente fractal da série em escalas de curto, médio e longo tempo, respectivamente (Castiglioni *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2017).

Entropia Amostral

Em termos práticos, a SampEn quantifica a probabilidade (logarítmica) de que padrões próximos de tamanho m continuarão próximos para $m + 1$. Em outras palavras, dentre os padrões de tamanho m que são similares, a SampEn indica qual porcentagem destes continuará similar para $m + 1$, isto é, quando um ponto a mais é considerado, **Figura 6**. Uma alta probabilidade de os padrões continuarem próximos indica alta regularidade, produzindo valores baixos de entropia.

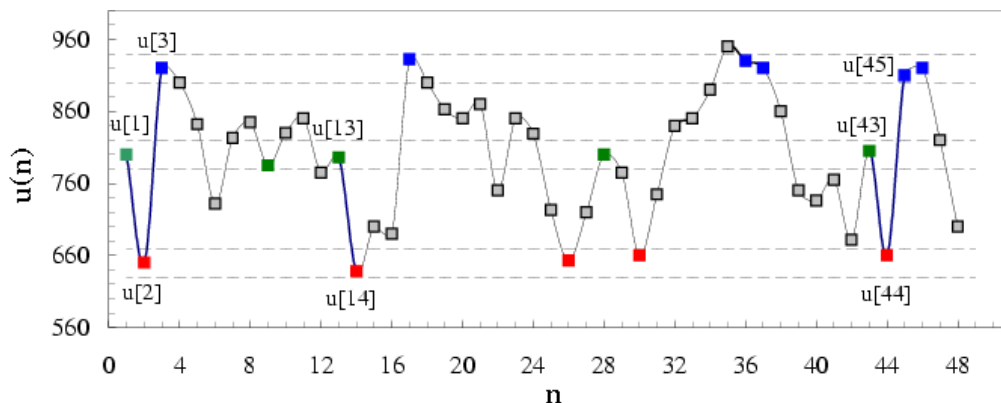


Figura 6: Exemplo de contagem de padrões no cálculo da SampEn. As linhas serrilhadas horizontais indicam a tolerância (r) para cada um dos três primeiros pontos da série iRR. Todos os pontos da série que estão no intervalo de tolerância do ponto $u[1]$ são mostrados em verde. O mesmo foi feito para os pontos $u[2]$ e $u[3]$, sendo representados em vermelho e azul, respectivamente. No caso de $m = 2$, existem 2 padrões que serão considerados iguais ($u[13], u[14]$) e ($u[43], u[44]$). Para $m = 3$, existe apenas 1 padrão considerado igual ($u[43], u[44], u[45]$). Adaptado de (Costa, Goldberger e Peng, 2005).

A escolha dos parâmetros m e r da SampEn é um aspecto importante. Enquanto valores muito altos de m ou muito pequenos de r podem levar a identificação de poucos padrões similares, o contrário (valores muito pequenos de m ou muito altos de r) pode acabar gerando perda de detalhes. Por ser uma medida útil para fenômenos de baixa dimensão, em geral um valor pequeno para m é suficiente na SampEn.

Embora a SampEn calcule a irregularidade ou imprevisibilidade de séries temporais, essa informação sozinha nem sempre é suficiente para caracterizar

um sistema. Para muitos autores, a entropia não é considerada uma medida de complexidade fisiológica, uma vez que em algumas situações, por exemplo na fibrilação atrial, a entropia da HRV é maior do que em indivíduos saudáveis. Seguindo o conceito de complexidade fisiológica, em que os sistemas saudáveis possuem suas estruturas operando em múltiplas escalas, surgiu uma nova abordagem para cálculo de entropia em uma medida que ficou conhecida com entropia multiescala (Costa, Goldberger e Peng, 2005). Nesse caso, a SampEn é calculada para várias escalas de uma série temporal, sendo que a complexidade se revela pela dependência da entropia com a escala.

A **Figura 7** ilustra o cálculo das diferentes escalas de uma série temporal. Uma vez geradas as séries para várias escalas, calcula-se a SampEn para cada uma das séries escalonadas e os resultados são apresentados em um gráfico de entropia versus escala.

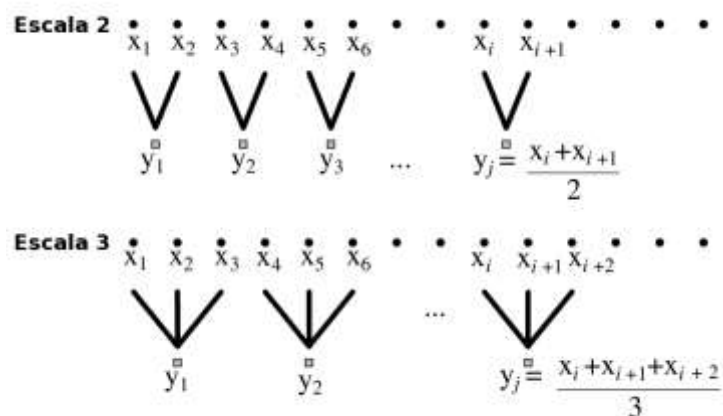


Figura 7: Ilustração da construção de séries em diferentes escalas para a entropia multiescala. Esta etapa é conhecida por *coarse-graining*. Para cada escala, a série y resultante equivale aos N/τ pontos obtidos pela média a cada τ pontos consecutivos, sem sobreposições. A figura ilustra o caso para $\tau = 2$ e $\tau = 3$, sendo x a série original. Adaptado de (Costa, Goldberger e Peng, 2005).

No presente estudo, os parâmetros para os cálculos da SampEn foram ajustados para $m=2$ e $r=15\%$ do desvio padrão do sinal e número de escalas avaliadas foi 20. Os valores foram expressos através da média das escalas de 1 a 5 e a média das escalas de 6 a 20.

3.3 Fragmentação da frequência cardíaca

No presente estudo, aplicamos a abordagem simbólica para o cálculo da HRF conforme descrito por Costa e colaboradores (Costa *et al.*, 2018; Costa, Davis e Goldberger, 2017a; Costa e Goldberger, 2019). Primeiramente, todas as séries são mapeadas para uma série simbólica ternária da seguinte forma: para cada valor de iRR, ou IP, o símbolo “- 1”, “0” ou “1” é atribuído se sua diferença para o intervalo anterior for positiva, nula ou negativa, respectivamente. Ou seja, “-1” se a frequência cardíaca diminui, “0” se não houver variação, e “1” se a FC aumenta de um batimento para outro.

É importante destacar aqui que há necessidade de se estabelecer um valor mínimo (limiar) para que valores sucessivos de intervalo cardíaco sejam considerados diferentes. O simples fato de registrar o ECG, ou a PA, com diferentes taxas de amostragem pode levar a um *viés* significativo para o cálculo da HRF caso não seja estabelecido um limiar adequado. Nesse estudo utilizamos um limiar adaptativo, no qual 1% do valor do intervalo anterior foi definido como a diferença mínima necessária para que o valor sucessivo seja considerado diferente. Ou seja, se um determinado intervalo cardíaco for 170 ms, o próximo deverá ser pelo menos 1,7 ms maior (ou menor) para ser considerado diferente, e assim sucessivamente.

Após a simbolização da série original, as transições entre símbolos são classificadas de acordo com o tipo de inflexão: transições do símbolo “-1” para “1” (ou você versa) são classificadas como pontos de inflexão do tipo *hard* (W^H), enquanto as transições dos símbolos “1”, ou “-1”, para “0”, são classificadas como do tipo *soft* (W^S). Observe que as transições entre símbolos iguais não configuram um ponto de inflexão.

Para a abordagem simbólica da HRF, sequências de quatro símbolos consecutivos, denominadas “palavras”, são classificadas de acordo com o número e com o(s) tipo(s) de pontos de inflexão presentes. Assim, as palavras W_0 , W_1 , W_2 ou W_3 referem-se à porcentagem de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão, respectivamente (independentemente do tipo), enquanto as palavras W^H , W^S ou W^M referem-se à porcentagem de padrões com apenas pontos de inflexão do tipo *hard*, *soft* ou ambos os tipos (*mixed*), respectivamente (independentemente do número). Os tipos de palavras W_0 e W_1 são os padrões menos fragmentados (mais “fluentes”), enquanto W_2 e W_3 são os mais

fragmentados. As palavras W^H , W^S e W^M não levam em conta a quantidade de fragmentação; em vez disso, eles representam apenas os diferentes tipos de pontos de inflexão, que podem fornecer informações adicionais sobre a dinâmica de padrões fragmentados. Além dos padrões simbólicos, também é calculada a porcentagem total de pontos de inflexão (PIP). A **Figura 8** ilustra o processo de cálculo dos padrões simbólicos da HRF.

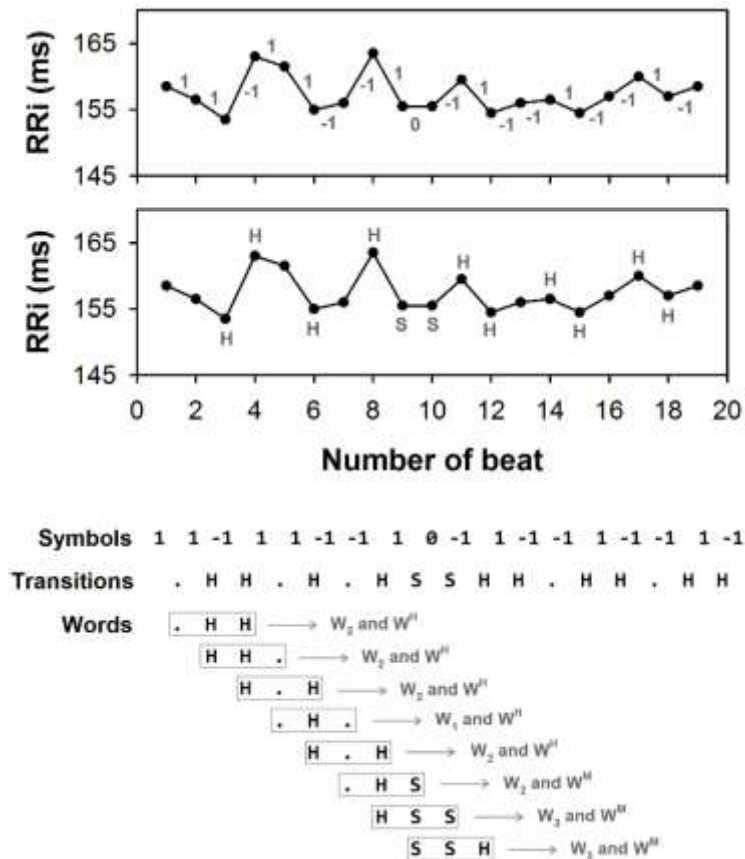


Figura 8: Ilustração do cálculo dos padrões de fragmentação da frequência cardíaca. O painel superior ilustra um trecho de uma série de iRR, mostrando as acelerações (símbolo “1”) e desacelerações (símbolo “-1”) da FC (gráfico superior) e pontos de inflexão do tipo *hard* (H) e *soft* (S) (gráfico inferior). Abaixo dos gráficos são ilustradas as séries de símbolos e de transições geradas a partir da série iRR original. Note que cada palavra é composta por 3 transições sucessivas (4 símbolos), sendo classificada de acordo com o número e o tipo de pontos de inflexão. W_0 , W_1 , W_2 e W_3 referem-se aos padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão, respectivamente (independentemente do tipo), enquanto W^H , W^S e W^M referem-se a palavras com pontos de inflexão apenas *hard*, *soft* ou ambos os tipos (*mixed*), respectivamente (independentemente do número).

O comprimento de cada palavra na abordagem da dinâmica simbólica da HRF foi proposto por Costa e colaboradores em seu artigo original (Costa, Davis e Goldberger, 2017c; b). Como os símbolos são calculados a partir da série de diferenças entre intervalos cardíacos consecutivos, palavras com três transições (quatro símbolos) representam o período de cinco batimentos cardíacos. Essa é uma boa janela para avaliar a presença de fragmentação, considerando que, em média, um ciclo respiratório ocorre dentro de cinco batimentos e que a modulação parassimpática autonômica acompanha o ritmo respiratório.

Os métodos descritos nesta seção, ou seja, processamento de registros cardiovasculares para geração de tacogramas, bem como o cálculo dos índices de HRV e HRF, foram aplicados a diferentes estudos que, juntos permitiram que os objetivos desse trabalho de pesquisa fossem atingidos.

Desse ponto em diante serão descritos separadamente cada um dos estudos que compõem esse trabalho de tese.

4. Estudo 1

Atividade Autonômica & Fragmentação
da Frequência Cardíaca

O coração possui um sistema especial capaz de gerar, automaticamente, impulsos elétricos rítmicos. Porém, a FC, gerada no nodo sino-atrial, é continuamente modulada pela atividade do SNA.

Há muito, está bem determinado que grande parte da variabilidade entre a duração dos sucessivos batimentos cardíacos, tem origem na modulação da atividade cronotrópica do coração pelo balanço entre as duas divisões do SNA, o simpático e o parassimpático (Task Force, 1996).

Assim, o estudo da HRV se estabeleceu como uma valiosa ferramenta para se avaliar as interações coração-cérebro por meio do SNA (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014; Task Force, 1996). Diversos índices da HRV, calculados nos domínios do tempo, da frequência, ou por métodos não lineares, guardam estreita relação com a modulação cardíaca pelo simpático e pelo parassimpático. Tal modulação é crucial para que o coração responda adequadamente aos desafios aos quais ele é constantemente submetido (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). Em outras palavras, uma boa modulação autonômica cardíaca é fundamental para a manutenção da homeostase circulatória. Então, por fornecer informações indiretas sobre o equilíbrio da modulação simpato-vagal cardíaca, o estudo da HRV traz elementos relevantes no que concerne ao risco de eventos cardiovasculares, inclusive de morte súbita de origem cardíaca (Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). Por exemplo, nas últimas décadas, estudos utilizando HRV documentaram o papel deletério da hiperatividade simpática na fisiopatologia em várias DCVs e sistêmicas (Seravalle e Grassi, 2016).

Diferente de alguns índices da HRV que guardam estreita relação com mecanismos fisiológicos conhecidos, os índices da HRF, apesar de reconhecidos como marcadores de risco cardíaco, não possuem, ainda, mecanismos conhecidos para sua gênese. Entretanto, é plausível imaginar que a atividade autonômica cardíaca tenha alguma influência nos parâmetros medidos pelo estudo da HRF.

No presente estudo, buscamos avançar na compreensão dos mecanismos que sustentam a geração de padrões fragmentados na FC. Utilizando o bloqueio farmacológico seletivo e combinado dos receptores autonômicos cardíacos em ratos, testamos a hipótese de que o controle autonômico cardíaco desempenha um papel na gênese da HRF.

4.1 Métodos

Animais

Os experimentos foram realizados em ratos da linhagem *Wistar Kyoto* (WKY, N=20) entre 7 e 15 semanas de idade, ou seja, adultos jovens. Os animais foram obtidos do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil). Também avaliamos ratos da linhagem *Sprague Dawley* (SD, N=22), na mesma faixa etária, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12h, e com livre acesso à ração comercial e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo: 069/2021 – Ratos WKY; e 206/2019 – Ratos SD).

Procedimentos cirúrgicos

Cateteres venosos foram confeccionados com tubos de polietileno (PE-10 e PE-50) e preenchidos com solução salina estéril 0,9%.

Os animais foram anestesiados (isoflurano e oxigênio) e tiveram a jugular dissecada e cateterizada. A extremidade livre do cateter foi exteriorizada na região interescapular. Além da cateterização venosa, os animais foram implantados com eletrodos subcutâneos para o registro do ECG. Os eletrodos também foram exteriorizados junto com o cateter venoso.

Todos os procedimentos cirúrgicos, neste e nos demais estudos desta tese, foram realizados em condições assépticas utilizados sempre material devidamente esterilizado. Além disso, todos os animais receberam drogas analgésicas (tramadol 12,5mg/kg) e antibiótico benzilpenicilina (24UI/g im em dose única) no período pós-operatório.

Registro do eletrocardiograma

Após um período de ambientação dos animais ao laboratório de registro, os eletrodos para registro do ECG foram conectados a um amplificador bioelétrico (Animal BioAmp FE136; ADInstruments, Bella Vista, Austrália),

acoplado a uma interface analógico/digital (PowerLab, ADInstruments, Sidney Australia) e amostrados (2 kHz) em um IBM/PC por meio do software LabChart (ADInstruments Dunedin, NZ). Os registros foram realizados sempre no mesmo período do dia para evitar influências circadianas nos resultados. Os animais estavam acordados e podiam se movimentar livremente durante os registros.

Protocolo experimental

Após dois dias de recuperação cirúrgica, os animais foram submetidos a bloqueios farmacológicos dos receptores autonômicos cardíacos de acordo com o seguinte protocolo: sob registro eletrocardiográfico contínuo, após um período basal de aproximadamente 1 hora, os animais receberam atenolol (4 mg/kg iv *in bolus*) e metil-atropina (2 mg/kg iv *in bolus*). Após aproximadamente 30 min, foi administrado metil-atropina aos ratos que receberam atenolol e vice-versa, e o registro continuou por mais aproximadamente 30 min com os animais sob duplo bloqueio autonômico cardíaco. No dia seguinte, o registro eletrocardiográfico foi repetido e os ratos receberam os bloqueadores de receptores autonômicos na ordem inversa. Em resumo, os animais foram submetidos ao registro basal, bloqueio autonômico seletivo (simpático ou vagal), seguido por duplo bloqueio autonômico.

A **Figura 9** mostra uma representação esquemática do protocolo experimental descrito acima. Destaco que experimentos preliminares (pilotos) foram realizados para determinar as doses de metil-atropina e atenolol utilizadas.

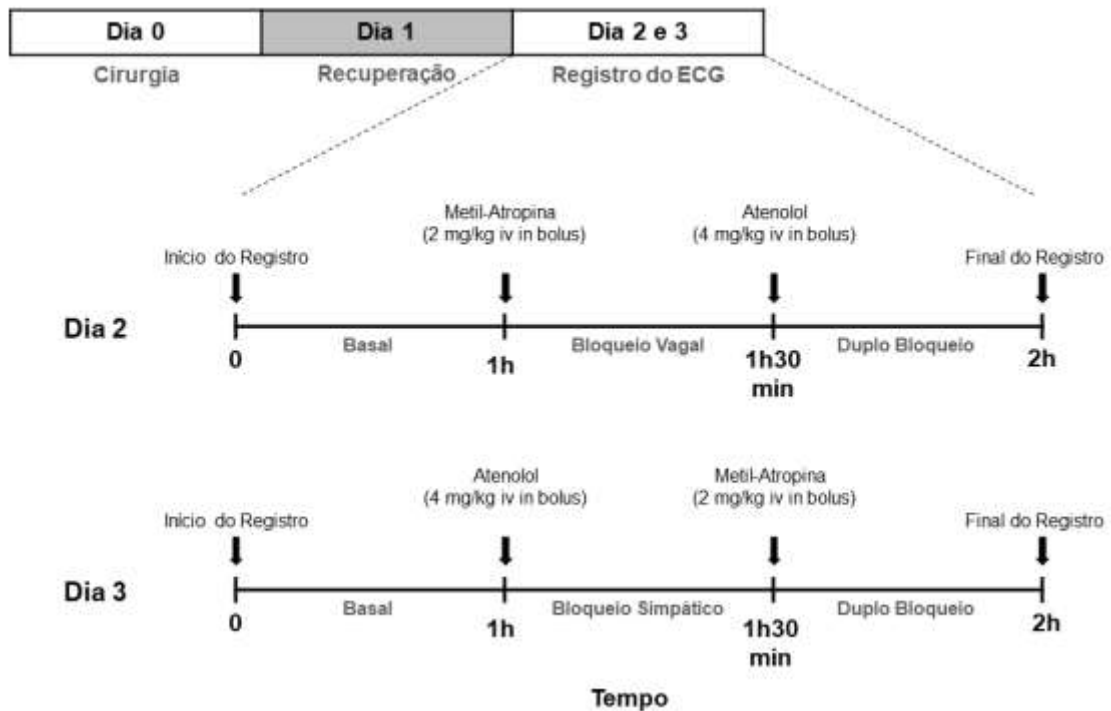


Figura 9: Protocolo experimental. Dois dias após o procedimento cirúrgico (implante de eletrodos de ECG e cateter venoso), os animais foram submetidos ao registro contínuo de ECG da seguinte forma: 1 hora sob condição basal seguida de 30 min sob bloqueio autonômico seletivo, ou seja, vagal ou simpático e 30 min sob bloqueio autonômico combinado (vagal + simpático).

A **Figura 10** mostra exemplos de séries iRR nas diferentes condições estudadas.

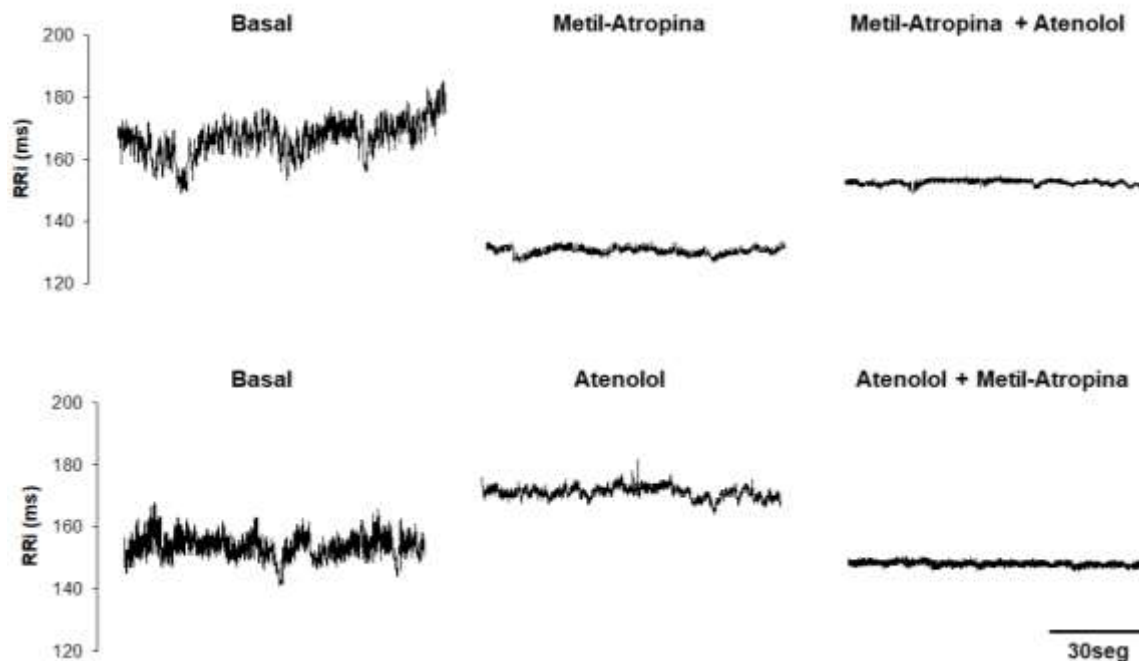


Figura 10: Séries representativas de valores de intervalo RR em condição basal, bloqueio vagal (metil-atropina), simpático (atenolol) ou bloqueio combinado (metil-atropina + atenolol).

Análise de dados

Os registros de ECG dos ratos, tanto do período basal, como sob bloqueio de receptores autonômicos foram utilizados para geração de séries, batimento a batimento da duração dos iRR e, após correção de artefatos, foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices de HRV: Análise no domínio do tempo, domínio da frequência, dinâmica simbólica, entropia, DFA e HRF.

A descrição da geração das séries com valores de iRR, correção de artefatos e cálculo dos índices da HRF estão detalhadamente descritas na seção 3 (página 35) desse texto.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças nos índices de HRF entre os registros basais e durante o bloqueio autonômico foram avaliadas pelo teste t pareado ou teste de Wilcoxon. As diferenças entre todas as condições basais, ou seja, os períodos antes do bloqueio simpático e antes do bloqueio parassimpático, foram verificadas pelo

teste t ou teste de Mann-Whitney. Como todos os índices de HRF foram semelhantes durante o período basal, é apresentado um único valor médio para o basal. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos como média \pm EPM.

4.2 Resultados

Conforme esperado, a administração de metil-atropina promoveu uma taquicardia enquanto a administração de atenolol reduziu a FC dos ratos de ambas as linhagens.

A **Tabela 1** apresenta os valores da FC, bem como todos os índices de HRF calculados a partir das séries de iRR de ratos da linhagem SD e ratos WKY. Os índices foram calculados durante as 3 fases dos registros eletrocardiográficos, ou seja, no período basal, durante o bloqueio seletivo e durante o bloqueio combinado (duplo bloqueio) dos receptores autonômicos cardíacos.

As **Figura 11A** e **11B** trazem a representação gráfica dos valores mostrados na tabela para os seguintes parâmetros em ratos da linhagem SD e ratos WKY, respectivamente: a PIP; a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - dos tipos W_0 a W_3 ; e a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - com pontos de inflexão do tipo W^H , W^S ou com ambos os tipos W^M .

Destaca-se a marcante redução da PIP e da ocorrência dos padrões W_2 e W_3 , bem como o aumento da ocorrência de padrões W_0 das séries, após o bloqueio de receptores muscarínicos ou após o duplo bloqueio de receptores autonômicos em ambas as linhagens. De forma geral, o bloqueio adrenérgico isoladamente não afetou os índices da HRF em ambas as linhagens de ratos avaliadas.

A porcentagem de padrões com pontos de inflexões do tipo W^H , e W^M diminuiu acentuadamente após o bloqueio dos receptores muscarínicos e também, em menor intensidade, após o duplo bloqueio de receptores autonômicos em ambas as linhagens.

Tabela 1: Frequência cardíaca e índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos Sprague Dawley ou Wistar Kyoto em condição basal ou durante o bloqueio dos receptores autonômicos cardíacos.

	Basal	Bloq. Vagal (m-atropina)	Bloq.Simpático (atenolol)	Bloq. Duplo
Sprague Dawley				
FC	340 ± 6	426 ± 6*	318 ± 4*	381 ± 4*
PIP	64,9 ± 1,6	29,7 ± 3,0*	63,4 ± 3,0	41,2 ± 4,0*
W ₀	14,1 ± 1,4	55,1 ± 3,8*	17,9 ± 2,4	42,3 ± 4,7*
W ₁	14,4 ± 0,7	12,5 ± 0,7	13,1 ± 1,0	12,2 ± 0,7
W ₂	34,2 ± 0,7	20,5 ± 1,6*	29,9 ± 0,9*	24,9 ± 1,9*
W ₃	37,3 ± 1,8	11,9 ± 1,9*	39,1 ± 3,3	20,6 ± 2,8*
W ^H	11,2 ± 1,3	0,8 ± 0,3*	10,5 ± 1,8	1,3 ± 0,4*
W ^S	35,7 ± 1,4	32,8 ± 2,6	31,6 ± 2,1	34,0 ± 2,2
W ^M	38,6 ± 1,6	11,3 ± 2,0*	39,9 ± 2,8	22,3 ± 3,1*
Wistar Kyoto				
FC	326 ± 9	378 ± 8*	301 ± 7*	325 ± 6
PIP	73,0 ± 2,6	25,5 ± 4,4*	70,5 ± 2,4	30,5 ± 3,6*
W ₀	10,3 ± 2,4	61,9 ± 6,0*	12,2 ± 1,8	55,5 ± 4,7*
W ₁	10,5 ± 0,7	10,1 ± 1,2	12,4 ± 0,8	11,8 ± 0,9
W ₂	29,1 ± 1,1	17,5 ± 2,6*	26,9 ± 1,3	18,3 ± 1,8*
W ₃	50,1 ± 2,7	10,5 ± 2,4*	48,5 ± 3,2	14,4 ± 2,5*
W ^H	22,0 ± 2,3	0,7 ± 0,3*	20,9 ± 3,2	4,1 ± 1,3*
W ^S	24,8 ± 1,3	25,2 ± 3,5	25,8 ± 1,9	22,3 ± 1,9
W ^M	42,9 ± 2,0	12,3 ± 2,9*	41,1 ± 1,7	18,1 ± 2,5*

FC: Frequência cardíaca (batimentos por minutos); PIP: Porcentagem de pontos de inflexão; W₀, W₁, W₂ e W₃: padrões ("palavras") com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H, W^S, W^M: padrões ("palavras") com pontos de

inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente. Os valores representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao período basal.

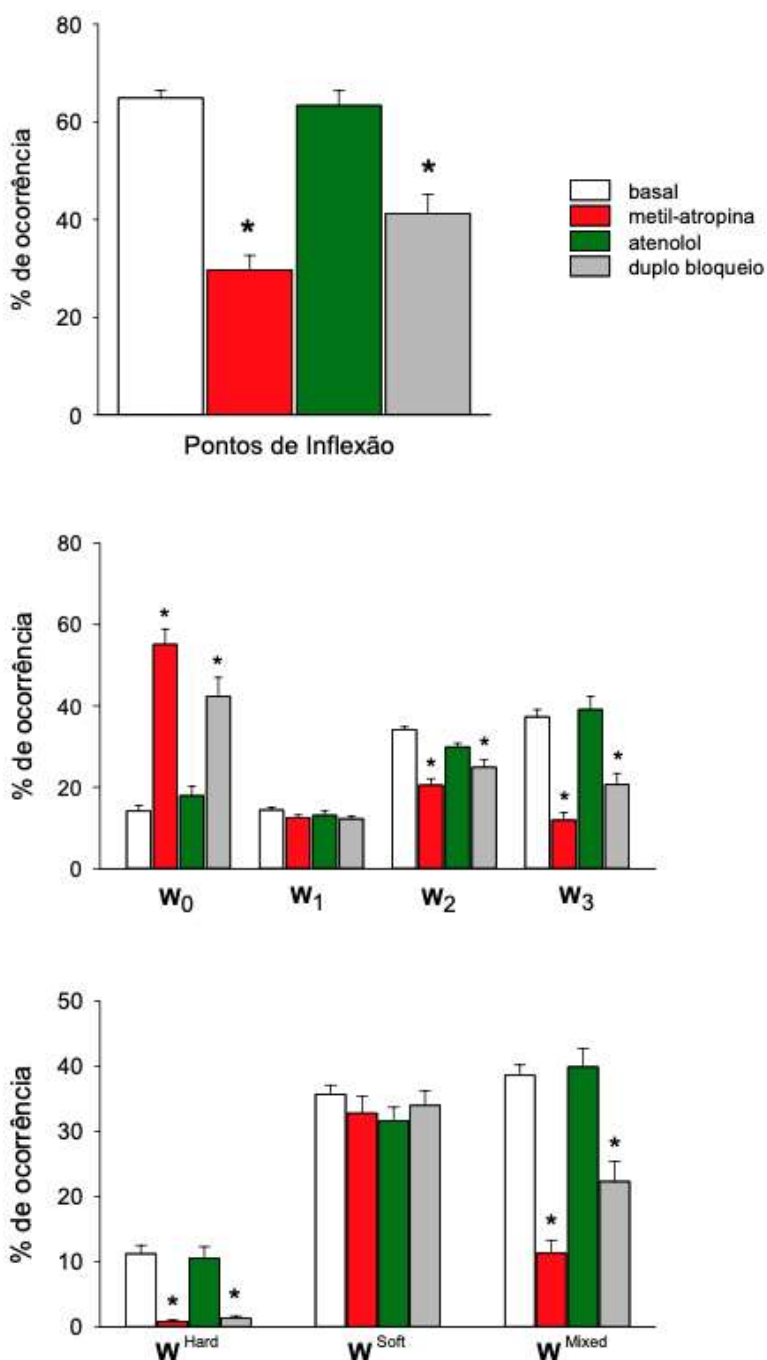


Figura 11A: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP); ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão; ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em condição basal, bloqueio vagal, simpático ou bloqueio combinado em ratos da linhagem Sprague Dawley. As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao período basal.

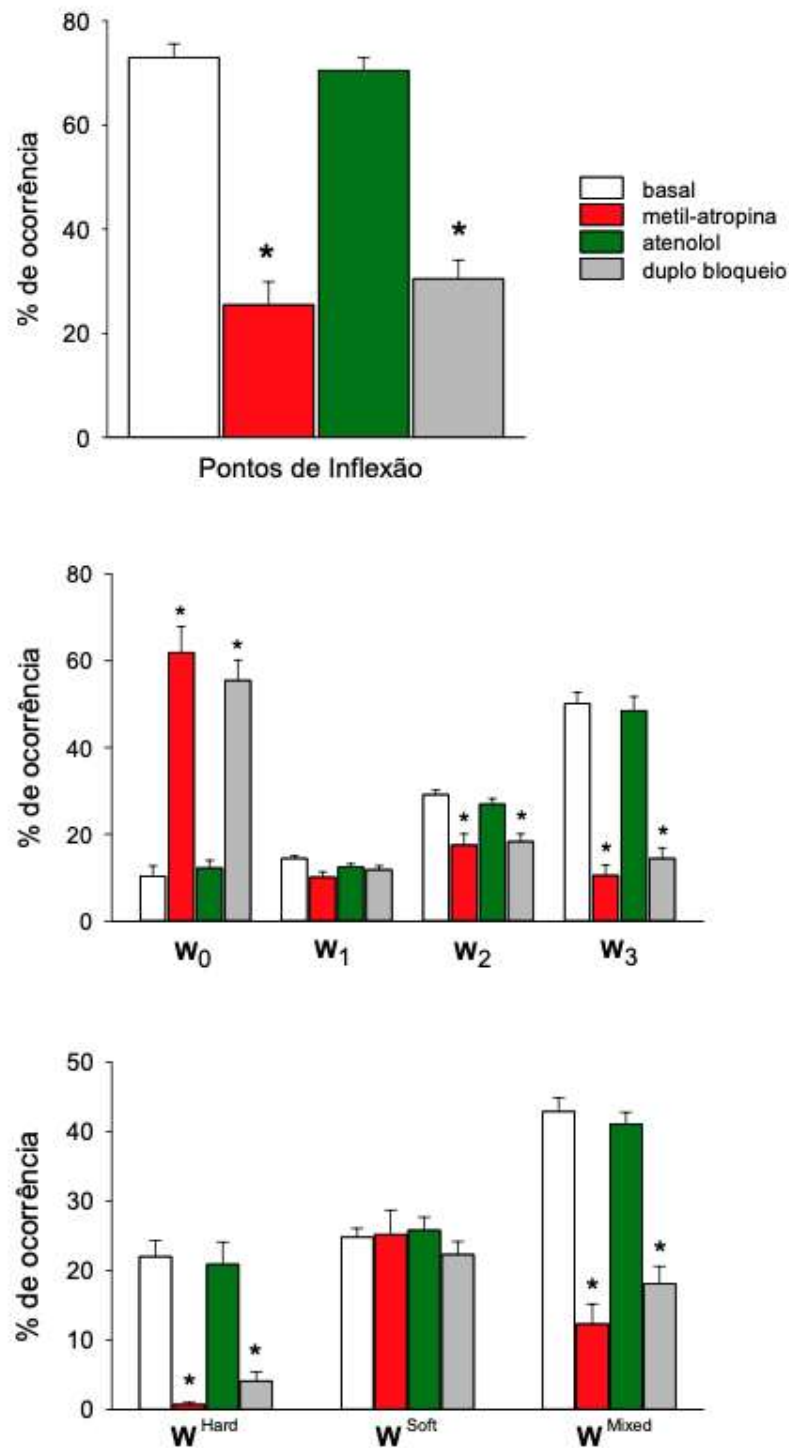


Figura 11B: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP); ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão; ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em condição basal, bloqueio vagal, simpático ou bloqueio combinado em ratos Wistar Kyoto. As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao período basal.

4.3 Discussão

Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito do bloqueio agudo de receptores autonômicos na HRF em ratos saudáveis. Quando os receptores cardíacos parassimpáticos (muscarínicos) são bloqueados seletivamente, a HRF diminui. Isso pode ser notado pela diminuição dos valores de PIP, e da ocorrência dos padrões do tipo W_3 e W^H (padrões fragmentados), bem como pelo aumento do percentual de W_0 (padrão fluente). Curiosamente, o mesmo efeito foi observado quando ambos os receptores (simpático e parassimpático) foram bloqueados simultaneamente, porém em uma menor intensidade. Já o bloqueio simpático (adrenérgico) de forma seletiva não alterou os índices da HRF. Em conjunto, esses resultados levam a crer que, apesar da HRF não ser influenciada pelo simpático, ela é bastante afetada pelo bloqueio parassimpático. De forma geral, a influência parassimpática contribui para o aumento dos padrões fragmentados da FC (PIP, W_3 e W^H).

Alguns estudos recentes especulam que mecanismos intrínsecos das células marcapasso, em nível molecular, são os únicos responsáveis pelo aparecimento de padrões de HRF (Lensen *et al.*, 2020). Vários estudos demonstraram a presença de variabilidade na taxa de disparos de potenciais de ação em células de marca-passo isoladas (Yaniv, Lyashkov e Lakatta, 2014). Isso se deve, principalmente, às oscilações naturais nas correntes iônicas na membrana (M-clocks) e na liberação/recaptação do cálcio iônico intracelular pelo sarcolema (Ca-clocks). A complexa inter-relação entre esses dois mecanismos (coupled-clocks) seria o responsável pela variabilidade intrínseca do marca-passo, ou seja, independente de fatores modulatórios (Yaniv, Lakatta e Maltsev, 2015).

Entretanto, apesar deste mecanismo ser um potencial fator para a gênese da HRF, aqui demonstramos que a divisão parassimpática do autônomo desempenha um papel relevante na gênese da HRF. Uma possível explicação para isso é o fato de que os padrões de HRF possuem componentes de frequência muito próximos à banda de frequência de ação do sistema parassimpático. Classicamente, assume-se que a influência parassimpática no coração ocorre na banda de alta frequência (HF) do espectro das séries de intervalo cardíaco. Porém, é razoável considerar que o vago tenha influências

além do limite da banda de HF, onde os padrões mais fragmentados estariam presentes.

Além de influenciar a quantidade pontos de inflexão na dinâmica da FC, a atividade vagal cardíaca também altera, marcadamente, o equilíbrio entre os pontos de inflexão dos tipos *hard* e *mixed* da FC, mas não os padrões do tipo *soft*. Desta forma, embora fique clara a influência vagal nos índices de HRF, esta influência se restringe aos padrões mais fragmentados. Além disso, como o simpático parece não ter nenhuma influência na HRF, os padrões do tipo *soft* podem ser uma boa alternativa para estudo de fatores envolvidos na fragmentação, que estão além da influência autonômica.

Uma das hipótese levantadas para explicar a presença da HRF é o aumento da atividade simpática (Costa *et al.*, 2018). No entanto, nossos achados sugerem que a atividade simpática não altera a HRF. Por outro lado, vale notar que o modelo experimental examinado no presente estudo, ou seja, ratos saudáveis em repouso, expressa níveis fisiológicos de controle autonômico, e podem existir diferenças quando comparados a modelos de ativação simpática crônica, como o rato espontaneamente hipertenso ou ratos com insuficiência cardíaca (IC). Logo, não descartamos que o simpático alterado em modelos de doenças, ou o efeito crônico do tono simpático aumentado, possam ter uma influência na HRF.

Os resultados sob completa ausência de influências adrenérgicas e colinérgicas cardíacas (duplo bloqueio autonômico) confirmaram que o SNA contribui para alterar a HRF. No entanto, apesar do simpático e o parassimpático não interagirem entre si de forma linear, é bem provável que as alterações encontradas após o duplo bloqueio sejam devidas ao bloqueio parassimpático. Além disso, durante o duplo bloqueio, é possível que haja maior influência dos mecanismos intrínsecos das células de marca-passo na HRF (Yaniv, Lakatta e Maltsev, 2015). Portanto, uma maior contribuição das propriedades eletrofisiológicas do tecido cardíaco na HRF durante o duplo bloqueio não pode ser descartada (Lensen *et al.*, 2020).

Até o momento, nenhum estudo demonstrou o real papel dos mecanismos intrínsecos das células de marca-passo na HRF. Nesse cenário, as doenças arritmogênicas podem ser de particular importância. Por exemplo, a síndrome do nódulo sinusal pode levar a distúrbios no ritmo cardíaco que seriam detectados

pelos índices da HRF. Neste caso, o desarranjo elétrico do coração é preponderante na dinâmica do ritmo cardíaco, tornando-se, provavelmente, o principal fator na gênese da HRF. Ressalta-se, porém, que a excitabilidade e a condutibilidade das células miocárdicas são afetadas não apenas pela atividade autonômica para o coração, mas também por fatores humorais, tornando ainda mais complexa a interpretação dos mecanismos isolados por trás da HRF.

Portanto, embora os mecanismos que geram um padrão fragmentado na FC ainda não tenham sido elucidados, nosso trabalho fornece evidências da influência do parassimpático na gênese de padrões de HRF, pelo menos no nível experimental (em ratos).

5. Estudo 2

Hipertensão Arterial & Fragmentação
da Frequência Cardíaca

De acordo com as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial publicadas em 2020, a hipertensão arterial é uma doença crônica não transmissível e de condição multifatorial, que depende de fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais. É caracterizada por elevação persistente da PA, ou seja, PA sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg, medida com a técnica correta, em pelo menos duas ocasiões diferentes, na ausência de medicação anti-hipertensiva (Barroso *et al.*, 2020).

É uma condição médica grave e o principal fator de risco modificável com associação independente, linear e contínua para DCVs. Possui uma enorme prevalência na população mundial, afetando, mais de um bilhão de pessoas no mundo, e representa a principal causa de morte prematura (Williams *et al.*, 2018). No período de uma década (2008 a 2017), foram estimadas 667.184 mortes atribuíveis à hipertensão arterial no Brasil (Barroso *et al.*, 2020).

A hipertensão arterial é a principal causa evitável de DCVs (Williams *et al.*, 2018). É de fácil diagnóstico e seu tratamento é, geralmente, eficaz utilizando-se um arsenal terapêutico diversificado, bastante eficiente e com poucos efeitos adversos. Mesmo assim, seu controle em todo o mundo é difícil, porque se trata de doença frequentemente assintomática, o que dificulta a adesão aos cuidados (Barroso *et al.*, 2020; Williams *et al.*, 2018).

Está bem estabelecido que a hiperatividade simpática é um fator muito importante na hipertensão arterial, participando de seu desenvolvimento e progressão (Grassi *et al.*, 2008; Malliani *et al.*, 1991; Salman, 2015). Sendo assim, a HRV, uma ferramenta valiosa usada como marcador da modulação autonômica cardíaca, pode fornecer informações prognósticas importantes em pacientes hipertensos (Maher *et al.*, 2018; Malliani *et al.*, 1991; Salman, 2015; Task Force, 1996).

Como visto anteriormente, valores reduzidos de HRV têm sido correlacionados com um prognóstico negativo para uma ampla gama de condições clínicas, incluindo a hipertensão arterial (Billman, 2011; Dorey, Moghtadaei e Rose, 2020; Shaffer, McCraty e Zerr, 2014). Pacientes hipertensos apresentam maiores valores da potência do espectro da HRV em LF e menores oscilações na banda de HF no espectro, em comparação com pacientes normotensos, sugerindo que, além da hiperatividade simpática, também ocorre

uma redução na atividade vagal nesses indivíduos (Guzzetti *et al.*, 1988; Langewitz, Rüddel e Schächinger, 1994; Malliani *et al.*, 1991; Pagani e Lucini, 2001). Outra evidência de uma redução na atividade vagal foi obtida em estudo no qual a atropina demonstrou provocar um aumento menor na FC em hipertensos jovens do que em normotensos (Seravalle, Mancia e Grassi, 2014). Além disso, pacientes hipertensos geralmente apresentam uma diminuição da sensibilidade barorreflexa (Schroeder *et al.*, 2003; Shaffer, McCraty e Zerr, 2014).

Aumentos anormais nos níveis plasmáticos dos neurotransmissores adrenérgicos norepinefrina e epinefrina foram repetidamente demonstrados em indivíduos normotensos com histórico familiar de hipertensão (Seravalle, Mancia e Grassi, 2014). Além disso, a análise espectral de séries de iRR mostrou alteração em ambas as divisões do SNA em indivíduos com maior risco de desenvolver hipertensão, mesmo quando uma anormalidade evidente da PA não era detectável. Isso sugere que a desregulação do SNA pode preceder o desenvolvimento da hipertensão arterial clínica (Schroeder *et al.*, 2003; Seravalle, Mancia e Grassi, 2014).

Com isso, considerando que a HRF é uma proposta recente e ainda necessita de avaliação em diferentes condições fisiopatológicas, este estudo teve como objetivo avaliar os índices da HRF em diferentes modelos de hipertensão arterial em ratos. Nossa hipótese é que a HRF está alterada pelos mecanismos subjacentes envolvidos na patogênese da hipertensão arterial.

5.1 Ratos espontaneamente hipertensos

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um dos modelos de hipertensão utilizados neste estudo, são um modelo de hipertensão genética considerado análogo à hipertensão primária humana (Okamoto e Aoki, 1963). De forma semelhante à hipertensão primária em humanos, os distúrbios hemodinâmicos encontrados nesses animais também são de origem multifatorial (Pravenec *et al.*, 2014).

Os SHR começam a desenvolver hipertensão com 5 semanas de vida, apresentando um nível de PA considerado como hipertensão espontânea entre a 7^a e a 15^a semana de idade, atingindo um platô entre a 20^a e 28^a semana de idade (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001).

A hipertensão do SHR está associada a um aumento da FC já na 3ª semana de vida, como resultado de um aumento na frequência intrínseca do marcapasso cardíaco. O modelo também apresenta um aumento na resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído. Com a progressão da hipertensão os animais desenvolvem hipertrofia cardíaca, e nos estágios finais a função cardíaca começa a ser comprometida ocorrendo uma diminuição no débito cardíaco em função de uma IC congestiva (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001).

Além disso, também foi demonstrado o papel da hiperatividade simpática no SHR, sendo observada uma redução da PA, em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica do ramo simpático do SNA (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001).

Com isso, este modelo oferece oportunidades relevantes para estudar os mecanismos que controlam a PA e as doenças associadas à hipertensão (Doris, 2017). Ratos da linhagem WKY foram usados como controles normotensos pois possuem o mesmo background genético dos SHR (Okamoto e Aoki, 1963).

5.2 Hipertensão de origem renovascular em ratos

Em 1934, Goldblatt e colaboradores (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001; Goldblatt *et al.*, 1934) mostraram uma elevação da PA de cães, cujo suprimento sanguíneo aos rins era reduzido por meio de um clipe colocado na artéria renal. Desde então, muitos modelos experimentais de hipertensão, baseados na redução do fluxo sanguíneo renal, têm sido desenvolvidos em várias espécies animais, recebendo o nome genérico de hipertensão de Goldblatt ou hipertensão secundária de origem renovascular (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001).

Ratos são os animais que desenvolvem hipertensão renovascular mais facilmente. A constrição de apenas uma artéria renal resulta em hipertensão, independentemente da presença ou ausência do rim contralateral.

Os modelos mais conhecidos são: dois rins um clipe (2R1C) no qual uma constrição parcial é produzida em um rim e o rim contralateral é deixado intacto, e um rim um clipe (1R1C) no qual uma nefrectomia é realizada no rim contralateral (Nabel, Gibbons e Dzau, 1985). Apesar da fisiopatogenia da hipertensão ser diferentes em ambos os casos, a função renal em termos de uréia e creatinina sanguíneas bem como o *clearance* de inulina, é completamente normal (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001).

O modelo de hipertensão do tipo 2R1C é caracterizado pela rápida secreção de renina e, conseqüentemente, hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Campos *et al.*, 2015; Martinez-Maldonado, 1991). A redução da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal impostos pela constrição da artéria renal são, certamente, o estímulo para o aumento da produção de renina no rim isquêmico (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001). Foi observado que a administração do anticorpo para angiotensina II e também inibidores de renina produzem uma queda na PA, sugerindo um maior grau de dependência de renina neste modelo de hipertensão (Dargie, Franklin e Reid, 1977; Martinez-Maldonado, 1991).

Já em animais hipertensos do tipo 1R1C, a atividade da renina plasmática é normal ou baixa quando comparada a animais com os 2 rins intactos. Isso ocorre devido a expansão do volume plasmático decorrente da retenção de sódio que é maior nesse modelo quando comparada ao modelo 2R1C, visto que o rim contralateral consegue excretar sódio normalmente (Fazan Jr, Silva e Salgado, 2001; Martinez-Maldonado, 1991; Pickering, 1989). Entretanto, um papel para o sistema nervoso simpático na hipertensão do tipo 1R1C foi sugerido por vários pesquisadores, mostrando que os níveis plasmáticos de norepinefrina estão elevados e que intervenções simpátolíticas centrais podem atenuar a hipertensão arterial neste modelo (Pickering, 1989).

De forma geral, a fase aguda da hipertensão renovascular é provavelmente a mesma em ambos os casos, no qual a constrição da artéria renal causa um aumento da secreção de renina, aldosterona e conseqüentemente da PA. Entretanto, após alguns dias ou semanas, a PA continua a aumentar, mas os níveis de renina e aldosterona podem voltar ao normal. Nesse estágio, o curso da hipertensão pode diferir dependendo da presença ou não do rim contralateral (Pickering, 1989).

Muito se fala da dependência de renina no modelo de hipertensão 2R1C, porém a literatura é contraditória em relação a presença ou não de componentes neurogênicos neste modelo. Trabalhos mais recentes mostram que entre 3-4 semanas após a clipagem, a simpato-excitação é um fator importante na manutenção da hipertensão (Campos *et al.*, 2015). E o possível mecanismo que desencadeia a disfunção autonômica está relacionado com a atuação da

angiotensina II em regiões responsáveis pela atividade simpática no bulbo (Campos *et al.*, 2015).

5.3 Métodos

Animais

Os experimentos foram realizados em SHR e seus respectivos controles normotensos (ratos WKY) com aproximadamente 15 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil). Para o estudo da hipertensão renovascular, foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 h e mantidos com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (SHR - Protocolo nº 069/2021, Hipertensão renovascular - Protocolo nº 1019/2021).

O estudo da HRF no modelo de hipertensão tipo 2R1C foi uma reanálise de registros diretos da PA de um estudo previamente realizado em nosso laboratório, cujos dados encontram-se publicados em (Nobre *et al.*, 2006). Os experimentos em ratos com hipertensão do tipo 1R1C foram realizados para esse estudo.

Protocolo Experimental

SHR

Inicialmente, a PA dos animais foi medida indiretamente pela técnica tail-cuff (CODA™, PA não invasiva, Kent Scientific Corporation).

Os procedimentos cirúrgicos do estudo com SHR (N=10) e ratos WKY (N=10), bem como o protocolo de registro eletrocardiográfico desses animais, foram semelhantes àqueles descritos no estudo 1, “Atividade autonômica e fragmentação da frequência cardíaca” e estão detalhadamente descritos anteriormente no texto (pág: 47).

Resumidamente, os ratos foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio e instrumentados com eletrodos para registro do ECG e, após 2 dias, tiveram o ECG basal registrado por aproximadamente 60 minutos.

Hipertensão renovascular 1R1C

Ratos Wistar (pesando aproximadamente 230g) foram anestesiados com uma mistura de cetamina/xilazina (50/10 mg/kg, i.p. respectivamente) e, por meio de uma laparotomia mediana, tiveram a artéria renal esquerda isolada e parcialmente obstruída por um clipe de prata, com abertura de 0,2 mm, implantado ao seu redor. A seguir, foram submetidos à nefrectomia contralateral. Ratos controle tiveram a artéria renal isolada, mas não receberam o clipe de prata e foram também submetidos à retirada total do rim direito. Foram utilizados um total de 10 animais por grupo, 1R1C e controles: N=10.

Após 60 dias, os animais foram novamente anestesiados com cetamina/xilazina e implantados com um cateter de polietileno na artéria femoral esquerda para registro direto da PA. A extremidade do cateter foi exteriorizada no dorso dos animais. No dia seguinte, os ratos tiveram a PA registrada por 30 min (frequência de amostragem de 1 kHz).

Hipertensão renovascular 2R1C

Os procedimentos cirúrgicos e o protocolo experimental utilizado no estudo da hipertensão renovascular tipo 2R1C encontram-se detalhadamente descritos em (Nobre *et al.*, 2006).

Resumidamente, ratos Wistar foram implantados com um clipe de prata de abertura 0,2 mm ao redor da artéria renal esquerda, sem nefrectomia contralateral. Ratos controle tiveram a artéria renal isolada, mas não receberam o clipe de prata. Foram utilizados 8 animais 2R1C e 11 animais controle.

Trinta dias após o procedimento cirúrgico, a PA média de todos os animais foi medida indiretamente pela técnica tail-cuff (CODA™, pressão arterial não invasiva, Kent Scientific Corporation) para monitorar o desenvolvimento da hipertensão. Apenas ratos com a PA superior a 150 mmHg foram incluídos no protocolo.

Após mais 15 dias, os animais foram anestesiados e implantados com um cateter de polietileno na artéria femoral esquerda para registro direto da PA. A

extremidade do cateter foi exteriorizada no dorso dos animais. No dia seguinte, os ratos tiveram a PA registrada (1kHz) por 180 min.

Registro da pressão arterial (hipertensão renovascular)

Após um período de ambientação dos animais ao laboratório de registro, os animais tiveram seu cateter arterial conectado a um transdutor de pressão (MLT844, ADInstruments, Austrália) acoplado a um amplificador (BioAmp, ADInstruments, Austrália). A PA foi registrada em um IBM/PC acoplado ao sistema de registro digital, PowerLab (ADInstruments, Austrália).

Os registros de PA nesse estudo foram realizados sempre no mesmo período do dia para evitar influências circadianas nos resultados. Os animais estavam acordados e podiam se movimentar livremente durante os registros.

Análise de dados

Os registros de ECG ou de PA dos ratos foram utilizados para geração de séries temporais, batimento a batimento da duração dos iRR, ou IP. Após correção de artefatos, as séries de ambos os estudos (SHR, 1R1C ou 2R1C) foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices de HRV: Análise do domínio do tempo, domínio da frequência, dinâmica simbólica, entropia, DFA e HRF.

A descrição da geração das séries com valores de iRR, ou IP, correção de artefatos e cálculo dos índices da HRF estão detalhadamente descritas na seção 3 (página 35) desse texto.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças nos índices entre ratos hipertensos e normotensos foram analisadas pelo teste t de Student não pareado ou teste de Wilcoxon. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos como média \pm EPM.

5.4 Resultados

A PA sistólica, média, diastólica e FC foram, como esperado, maiores nos animais hipertensos quando comparados aos respectivos controles normotensos (**Tabela 2**).

Os valores de PA dos animais SHR e WKY foram obtidos indiretamente pela técnica *tail-cuff* e a FC foi obtida pela análise do registro de ECG. Os valores de PA e FC dos animais 1R1C e 2R1C e os respectivos controles foram obtidos pela medida direta da PA.

Tabela 2: Pressão arterial sistólica (PAS), média (PAM), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos hipertensos SHR, 1R1C, 2R1C e os respectivos controles normotensos (WKY ou Controle).

	WKY	SHR	Co 1R1C	1R1C	Co 2R1C	2R1C
PAS (mmHg)	126 ± 4	170 ± 5*	126 ± 2	244 ± 15*	124 ± 3	195 ± 8*
PAM (mmHg)	93 ± 4	137 ± 6*	102 ± 2	197 ± 12*	105 ± 2	171 ± 9*
PAD (mmHg)	77 ± 4	121 ± 6*	85 ± 1	159 ± 10*	90 ± 2	149 ± 9*
FC (bpm)	291 ± 5	311 ± 7*	320 ± 12	371 ± 17*	375 ± 11	381 ± 3

Os valores representam a média ± EPM. * $P < 0,05$ vs. respectivo controle (WKY ou Controle). bpm: batimentos por minuto.

A **Tabela 3** apresenta todos os índices de HRF calculados a partir das séries de iRR de SHR ou séries de IP de ratos hipertensos 1R1C, 2R1C e os respectivos controles normotensos (WKY ou Controle).

As **Figuras 12 e 13** trazem a representação gráfica dos valores mostrados na tabela para os seguintes parâmetros: **(A)** a PIP; **(B)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - dos tipos W_0 a W_3 ; e **(C)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - com pontos de inflexão do tipo W^H , W^S ou com ambos os tipos W^M em SHR e seu controle normotenso WKY (**Figura 12**) e em ratos com hipertensão renovascular e seus respectivos controles normotensos (**Figura 13**).

Tabela 3: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos hipertensos SHR, 1R1C, 2R1C e os respectivos controles normotensos (WKY ou Controle).

	WKY	SHR	Co 1R1C	1R1C	Co 2R1C	2R1C
PIP	72 ± 5	72 ± 1	80 ± 1	77 ± 2	79 ± 1	64 ± 7*
W ₀	10 ± 4	7 ± 1	3 ± 1	6 ± 1	3 ± 1	18 ± 6*
W ₁	11 ± 1	13 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	13 ± 2*
W ₂	31 ± 1	41 ± 1*	35 ± 1	32 ± 1	39 ± 1	30 ± 1*
W ₃	48 ± 4	41 ± 1	54 ± 2	53 ± 3	50 ± 1	39 ± 7
W ^H	21 ± 3	15 ± 3	27 ± 3	23 ± 4	26 ± 3	12 ± 4*
W ^S	26 ± 2	34 ± 3*	21 ± 2	23 ± 2	23 ± 2	30 ± 3
W ^M	43 ± 3	45 ± 1	49 ± 1	48 ± 2	48 ± 1	40 ± 5

PIP: Porcentagem total de pontos de inflexão; W₀, W₁, W₂ e W₃: porcentagem de ocorrência de padrões (palavras) com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H, W^S, W^M: porcentagem de ocorrência de padrões (palavras) com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente. Os valores representam a média ± EPM. * P<0,05 vs respectivo controle normotenso (WKY ou Controle).

Destaca-se que a PIP bem como a ocorrência dos padrões W₀, W₁, W₃, W^H e W^M não foi diferente entre SHR e ratos controles normotensos (WKY). Entretanto, a porcentagem de padrões do tipo W₂ e W^S foram maiores em SHR quando comparado ao seu controle. Nos animais 1R1C todos os parâmetros analisados foram semelhantes aos respectivos controles normotensos.

Já nos animais 2R1C, a PIP, a ocorrência de padrões do tipo W₂ e W^H foram menores quando comparado ao controle normotenso. Em contrapartida, a ocorrência de padrões do tipo W₀ e W₁ foram maiores nos animais 2R1C quando comparado aos seus pares. A ocorrência de padrões W₃, W^S e W^M não foram diferentes entre hipertensos e normotensos.

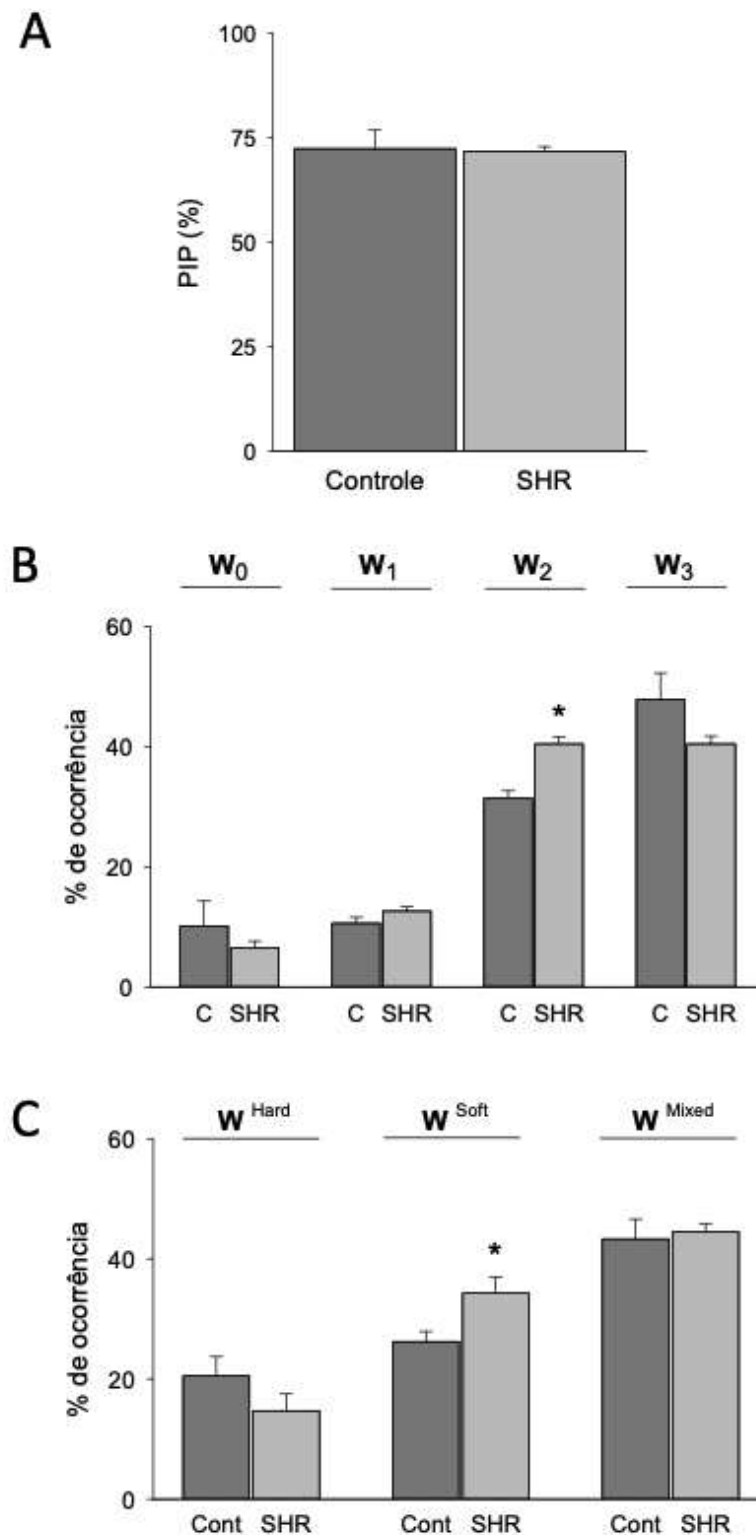


Figura 12: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP) em (A); ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão em (B); ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em (C) em SHR e seus controles normotensos WKY. As barras representam a média \pm EPM. *P<0,05 vs. WKY.

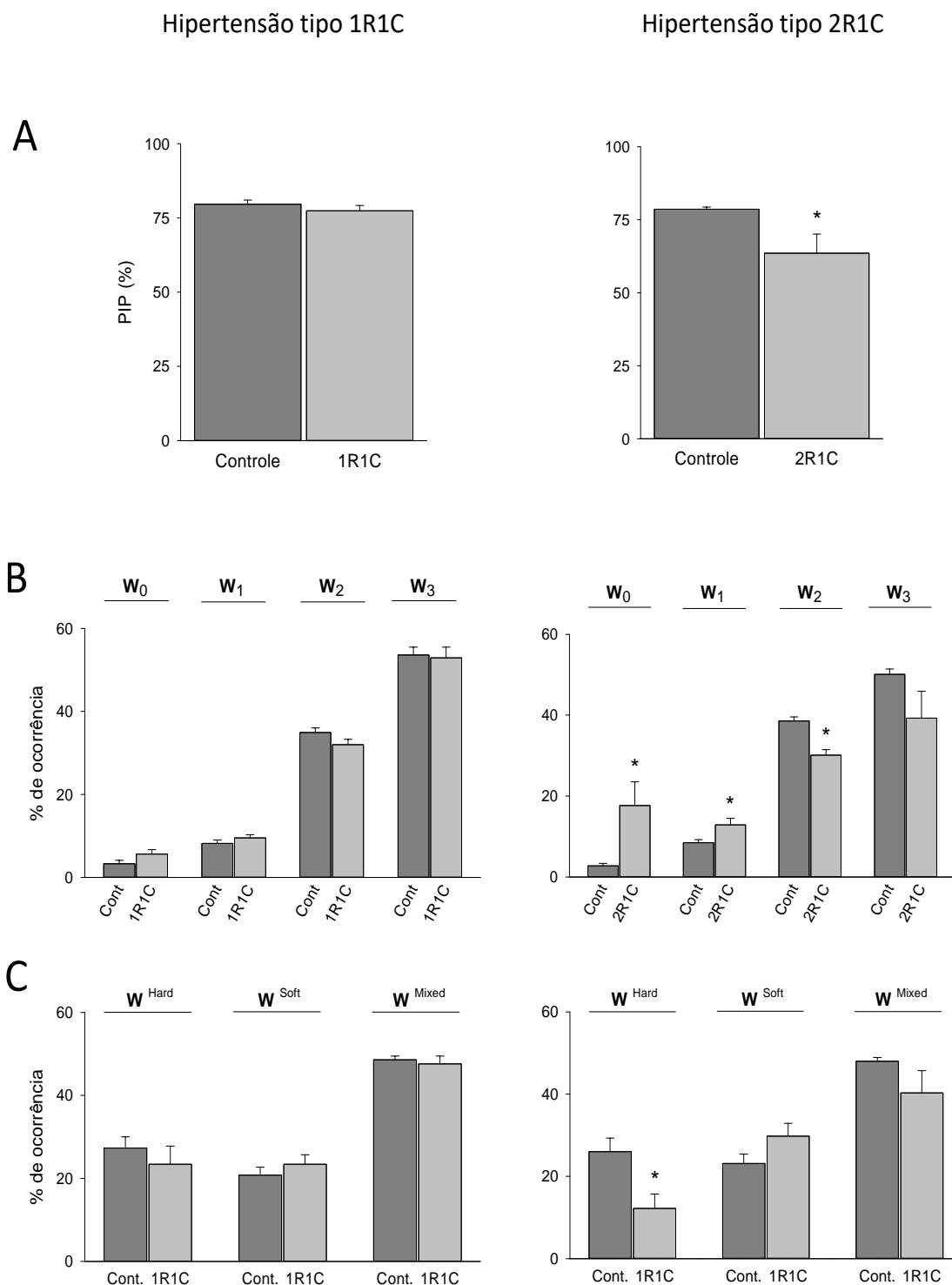


Figura 13: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP) em (A); ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão em (B); ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em (C) em ratos hipertensos tipo 1R1C e 2R1C. As barras representam a média \pm EPM. *P<0,05 vs. controles.

5.5 Discussão

Este é o primeiro estudo avaliando a HRF em modelos experimentais de hipertensão arterial. Interessante notar que o padrão de fragmentação é diferente dependendo do modelo de hipertensão estudado, mostrando que o aumento dos níveis pressóricos, de forma isolada, não é suficiente para causar alteração na HRF. De modo geral, a HRF não muda em SHR e em ratos com hipertensão renovascular do tipo 1R1C, porém é menor em ratos com hipertensão renovascular do tipo 2R1C em comparação aos seus respectivos controles normotensos. Isso pode ser notado pela diminuição dos valores de PIP e W_2 (padrões mais fragmentados), bem como pelo aumento percentual de W_0 e W_1 (padrões mais “fluentes”) apenas nos animais 2R1C. Além disso, a porcentagem de padrões agrupados pelo tipo de pontos de inflexão, W^H , foi menor em ratos hipertensos tipo 2R1C.

Os SHR e o modelo de hipertensão do tipo 1R1C no rato, apesar de possuírem diferentes etiologias e fisiopatologias, são ambos modelos de hipertensão caracterizados por uma marcante hiperativação simpática e diminuição da atividade vagal (Fisher e Paton, 2012; Freitas *et al.*, 2020; Pickering, 1989; Schroeder *et al.*, 2003). Além disso, a literatura mostra que ambos os modelos possuem notória alteração nos índices de variabilidade da FC e PA, bem como de índices que refletem a função do barorreflexo arterial (Fisher e Paton, 2012; Freitas *et al.*, 2020; Schroeder *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2008). Entretanto, apesar dessas alterações reportadas na literatura, não foram encontradas diferenças nos índices da HRF nestes modelos, mostrando que as alterações cardiovasculares e/ou autonômicas deles não se refletem na HRF. Este é um forte indício de que a presença da hiperativação simpática crônica, juntamente com diminuição da modulação vagal, não altera os padrões de HRF em modelos experimentais.

Por outro lado, o rato com hipertensão renovascular do tipo 2R1C é classicamente conhecido pela hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Campos *et al.*, 2015; Martinez-Maldonado, 1991). Também foi mostrada uma importante atuação do SNA simpático na manutenção da hipertensão arterial nesse modelo, uma vez que o tratamento crônico de coelhos com um inibidor da atividade simpática de ação central foi capaz de normalizar

a PA (Burke, Evans e Head, 2011). Porém estudos anteriores mostraram que a HRV, ao menos quanto a análise espectral, não está modificada nesse modelo, e que o componente oscilatório na banda de LF do espectro da PA é maior em ratos 2R1C, sugerindo que o aumento da atividade simpática deste modelo está nas eferências para a vasculatura (Nobre *et al.*, 2006). Curiosamente, apenas os ratos hipertensos tipo 2R1C apresentaram diferenças nos índices da HRF, com diminuição dos padrões mais fragmentados quando comparado aos respectivos controles normotensos. Como as alterações autonômicas no coração são bem mais evidentes nos SHR e nos ratos com hipertensão do tipo 1R1C do que no modelo 2R1C, esses resultados, em conjunto, sugerem fortemente a presença de mecanismos não autonômicos influenciando a gênese da HRF.

Os estudos pioneiros de Costa e colaboradores demonstraram que a HRF aumenta com o envelhecimento e que o aumento desta está significativamente associado à maior incidência de eventos cardiovasculares adversos (Costa *et al.*, 2018). Esses achados sugerem que o aumento da HRF está associado à perda de complexidade fisiológica. Curiosamente, nossos achados mostraram que a HRF não se altera ou é menor em modelos experimentais de hipertensão, embora estes modelos (doenças) possam ser caracterizados pela perda de complexidade fisiológica. A interpretação desses achados, aparentemente contraditórios, é desafiadora. É possível que os níveis elevados de angiotensina na hipertensão do tipo 2R1C, bem como outros fatores humorais alterados neste modelo, estejam afetando, diretamente ou indiretamente, as células de marca-passo cardíaco, tornando seus potenciais de ação mais estáveis. Porém, os mecanismos específicos pelos quais isso poderia acontecer ainda precisam ser estudados.

Até aqui, nosso estudo mostrou que a modulação vagal cardíaca desempenha um papel significativo no padrão de fragmentação e que modelos experimentais de hipertensão caracterizados por hiperativação simpática e redução da atividade vagal, por si só, não alteram a HRF. Com a redução da atividade vagal nos SHR e nos ratos com 1R1C, era de se esperar uma diminuição da HRF, já que, a princípio, o simpático parece não influenciar a HRF. Porém, a HRF não está alterada nestes modelos, revelando a complexidade dos sistemas fisiológicos e a difícil tarefa de identificar mecanismos “microscópicos”

para fenômenos “macroscópicos”, quando há interação não linear entre os componentes.

6. *Estudo 3*

Diabete Melito & Fragmentação da
Frequência Cardíaca

O Diabetes Melito (DM) é uma síndrome clínica na qual o organismo não produz insulina em quantidade suficiente ou não consegue empregar adequadamente a insulina que produz (Boyko *et al.*, 2021; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022). É caracterizada por um aumento da concentração de glicose sanguínea (hiperglicemia) acompanhada de disfunções e complicações de outros órgãos (Goyal *et al.*, 2016).

Atualmente, 537 milhões de adultos entre 20 e 79 anos vivem com DM em todo o mundo. Este número deverá aumentar para 643 milhões em 2030 e 783 milhões em 2045. O DM foi responsável por 6,7 milhões de mortes em 2021 - 1 a cada 5 segundos e causou pelo menos US\$ 966 bilhões em gastos com saúde - um aumento de 316 % nos últimos 15 anos. Além disso, 541 milhões de adultos têm intolerância à glicose, o que os coloca em alto risco de desenvolver DM do tipo 2 (Boyko *et al.*, 2021).

Atualmente, o diagnóstico para DM acontece quando um ou mais dos seguintes critérios estão presentes: glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, glicose plasmática duas horas após administração oral de 75 g de glicose (teste oral de tolerância à glicose) ≥ 200 mg/dL, hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ e glicose plasmática aleatória, na presença de sintomas de hiperglicemia, ≥ 200 mg/dL. Além disso, a Associação Americana de Diabetes recomenda o diagnóstico de pré-diabetes com valores de hemoglobina glicada entre 5,7 e 6,4% e glicemia de jejum entre 100 e 125mg /dL (Boyko *et al.*, 2021).

Os tipos mais comuns de DM são o tipo 1 e o tipo 2. O DM tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pelo aumento da concentração de glicose no sangue devido à marcante deficiência de insulina decorrente da perda das células β das ilhotas pancreáticas. Acomete entre 5 e 10% do total de pessoas com a doença e é uma das condições endócrinas e metabólicas mais comuns que ocorrem na infância, mas pode ocorrer em qualquer idade (Boyko *et al.*, 2021; DeFronzo *et al.*, 2015; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022).

Estudos relataram a presença de autoanticorpos meses ou anos antes do início da doença. Esses autoanticorpos servem como biomarcadores do desenvolvimento de autoimunidade (Katsarou *et al.*, 2017). Já em um subgrupo menor de pacientes, nenhuma resposta imune ou autoanticorpos são detectados, e a causa da destruição das células β é desconhecida (Katsarou *et al.*, 2017).

O DM tipo 2 (DM2) é caracterizado pela desregulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultando na secreção deficiente de insulina, resistência à insulina ou uma combinação de ambos. O DM2 é o tipo mais comum de diabetes, representando mais de 90 % de todos os casos (DeFronzo *et al.*, 2015). Indivíduos com DM2 possuem um alto risco de desenvolverem complicações microvasculares (incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia) e complicações macrovasculares (como DCVs) (DeFronzo *et al.*, 2015).

O principal fator que leva ao desenvolvimento da DM2 é a secreção prejudicada de insulina pelas células β pancreáticas, geralmente em um contexto de resistência à insulina preexistente no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Inicialmente a hiperglicemia é o resultado da incapacidade das células do corpo de responder adequadamente à insulina produzida (resistência à insulina), resultando em um aumento da produção de insulina. Com o tempo, a produção inadequada de insulina pode se desenvolver como resultado da falha das células β pancreáticas em acompanhar a alta demanda (Boyko *et al.*, 2021). Fatores ambientais (obesidade, dieta não saudável e inatividade física) e fatores genéticos contribuem para os múltiplos distúrbios fisiopatológicos que são responsáveis pelo comprometimento da homeostase da glicose no DM2 (DeFronzo *et al.*, 2015).

O DM é uma condição que afeta de modo muito severo a função autonômica. A neuropatia autonômica cardíaca é uma complicação comum do DM e, frequentemente, está associada a alta mortalidade por eventos cardiovasculares (Benichou *et al.*, 2018). A neuropatia autonômica diabética é difícil de identificar, embora alguns pacientes apresentem alteração da FC em repouso (Pagani *et al.*, 1988). Sendo assim, a HRV é o padrão ouro para identificar essa condição, contribuindo, sobremaneira, para o tratamento precoce das complicações cardiovasculares em pacientes diabéticos (Benichou *et al.*, 2018; Pagani *et al.*, 1988).

É consenso que o diagnóstico precoce e o acesso a cuidados adequados para todos os tipos de DM podem evitar ou retardar complicações em pessoas que vivem com a doença. Assim, estudos clínicos e experimentais sobre DM são muito importantes para reduzir o impacto da doença e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2022).

Experimentalmente podemos induzir o DM através da administração de estreptozotocina (STZ). A STZ foi descoberta em 1959, e desde então tem sido amplamente utilizada para a indução de DM em animais de experimentação (Goyal *et al.*, 2016). As alterações estruturais, funcionais e bioquímicas observadas no DM induzida por STZ assemelham-se ao DM1 em humanos. Portanto, o diabetes induzido por STZ representa um modelo clinicamente relevante para estudar a patogênese e complicações associadas ao DM em animais experimentais (Goyal *et al.*, 2016). O DM1 é induzido em animais experimentais por uma única injeção de STZ.

A STZ possui um peso molecular de 265 g/mol, fórmula molecular $C_8H_{15}N_3O_7$ e possui uma meia-vida biológica curta, entre 5 e 15 min. Sendo um análogo da glicose, ela entra e acumula-se intracelularmente nas células β pancreáticas através do sistema transportador GLUT2 (transportador de glicose de baixa afinidade localizado na membrana plasmática), e resulta na citotoxicidade dessas células. A propriedade diabetogênica da STZ é caracterizada pela destruição seletiva das células β , deficiência da produção de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria que se assemelham ao DM em humanos (Goyal *et al.*, 2016).

Nesse contexto, sabendo que o DM é uma síndrome clínica que leva a diversas complicações no organismo, incluindo cardiovasculares e autonômicas, este estudo propõe investigar como se comporta o padrão de HRF em animais diabéticos e se esse novo índice pode ser futuramente usado como um biomarcador de alterações cardiovasculares em pacientes diabéticos.

6.1 Métodos

Animais

Os ratos da linhagem SD utilizados nesse estudo foram provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12 h e mantidos com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina

de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo nº 206/2019).

Protocolo experimental

Para indução do DM, ratos SD pesando aproximadamente 285 g, em jejum de 8 a 12 horas e anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio e receberam uma única injeção de STZ (50 mg/kg, dissolvido em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5) na veia peniana. Um volume equivalente de veículo (tampão citrato 0,1 M, pH 4,5) foi administrado nos animais controle. O desenvolvimento do DM foi confirmado após 72 horas pela verificação da hiperglicemia (> 350 mg/dL).

Após 4 dias (diabete agudo), ou 4 semanas (diabete crônico), da administração de STZ ou veículo os ratos foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio e instrumentados com eletrodo subcutâneo para registro do ECG, conforme descrito na página 47. Após 48 horas foi realizado o registro do ECG, conforme descrito na página 47, em condição basal por aproximadamente 60 minutos.

Análise de dados

Os registros de ECG dos ratos foram utilizados para geração de séries, batimento a batimento da duração dos iRR e, após correção de artefatos, foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices de HRV: Análise do domínio do tempo, domínio da frequência, dinâmica simbólica, entropia, DFA e HRF.

A descrição da geração das séries com valores de iRR, correção de artefatos e cálculo dos índices da HRF estão detalhadamente descritas na seção 3 (página 35) desse texto.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças nos índices entre os grupos foram analisadas pelo teste t de Student não pareado ou teste de Wilcoxon. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são expressos como média \pm EPM. Diabete agudo (STZ: N=9, Veículo: N=12). Diabete crônico (STZ: N=10, Veículo: N=10).

6.2 Resultados

A concentração sérica de glicose, parâmetro utilizado para verificação da efetividade da indução do DM, foi, como esperado, bem maior nos animais que receberam STZ quando comparada aos ratos controle injetados com veículo. O grupo agudo apresentou glicemia de 464 ± 22 vs. 152 ± 4 mg/dL enquanto a glicemia do grupo crônico foi de 461 ± 12 vs. 137 ± 2 mg/dL.

A **Tabela 4** apresenta todos os índices de HRF calculados a partir das séries de iRR de ratos com diabetes agudo ou crônico e seus respectivos controles normoglicêmicos.

A **Figura 14** mostra a representação gráfica dos valores mostrados na tabela para os seguintes parâmetros: **(A)** a PIP; **(B)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - dos tipos W_0 a W_3 ; e **(C)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - com pontos de inflexão do tipo W^H , W^S ou com ambos os tipos W^M .

Tabela 4: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos com diabetes agudo ou crônico e seus respectivos controles normoglicêmicos.

	Agudo		Crônico	
	Controle	Diabete	Controle	Diabete
PIP	67 ± 2	$73 \pm 2^*$	62 ± 3	$72 \pm 4^*$
W_0	13 ± 2	$8 \pm 1^*$	16 ± 2	$9 \pm 2^*$
W_1	14 ± 1	$11 \pm 1^*$	15 ± 1	$10 \pm 1^*$
W_2	33 ± 1	31 ± 2	35 ± 1	34 ± 2
W_3	40 ± 2	$50 \pm 2^*$	33 ± 2	$47 \pm 3^*$
W^H	13 ± 2	$19 \pm 3^*$	10 ± 2	$19 \pm 5^*$
W^S	34 ± 2	28 ± 2	38 ± 2	$26 \pm 3^*$
W^M	41 ± 2	43 ± 2	37 ± 3	44 ± 4

PIP: Porcentagem total de pontos de inflexão; W_0 , W_1 , W_2 e W_3 : porcentagem de ocorrência de padrões (palavras) com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H , W^S , W^M : porcentagem de ocorrência de padrões (palavras)

com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente. Os valores representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs respectivo controle normoglicêmico.

Destaca-se que a ocorrência de PIP e de padrões do tipo W_3 aumentou, porém a ocorrência de padrões W_0 e W_1 foi menor nos animais com diabetes agudo ou crônico quando comparado aos seus respectivos controles normotensos. A ocorrência de padrões do tipo W_2 não foi diferente entre os grupos.

A ocorrência de padrões W^M foi semelhante entre diabéticos e controles. Entretanto, a ocorrência de padrões do tipo W^H foi maior em animais com diabetes agudo ou crônico quando comparado ao seu controle. A ocorrência de padrões do tipo W^S foi menor em animais com diabetes crônico quando comparado ao seu controle, mas não alterou em animais com diabetes aguda.

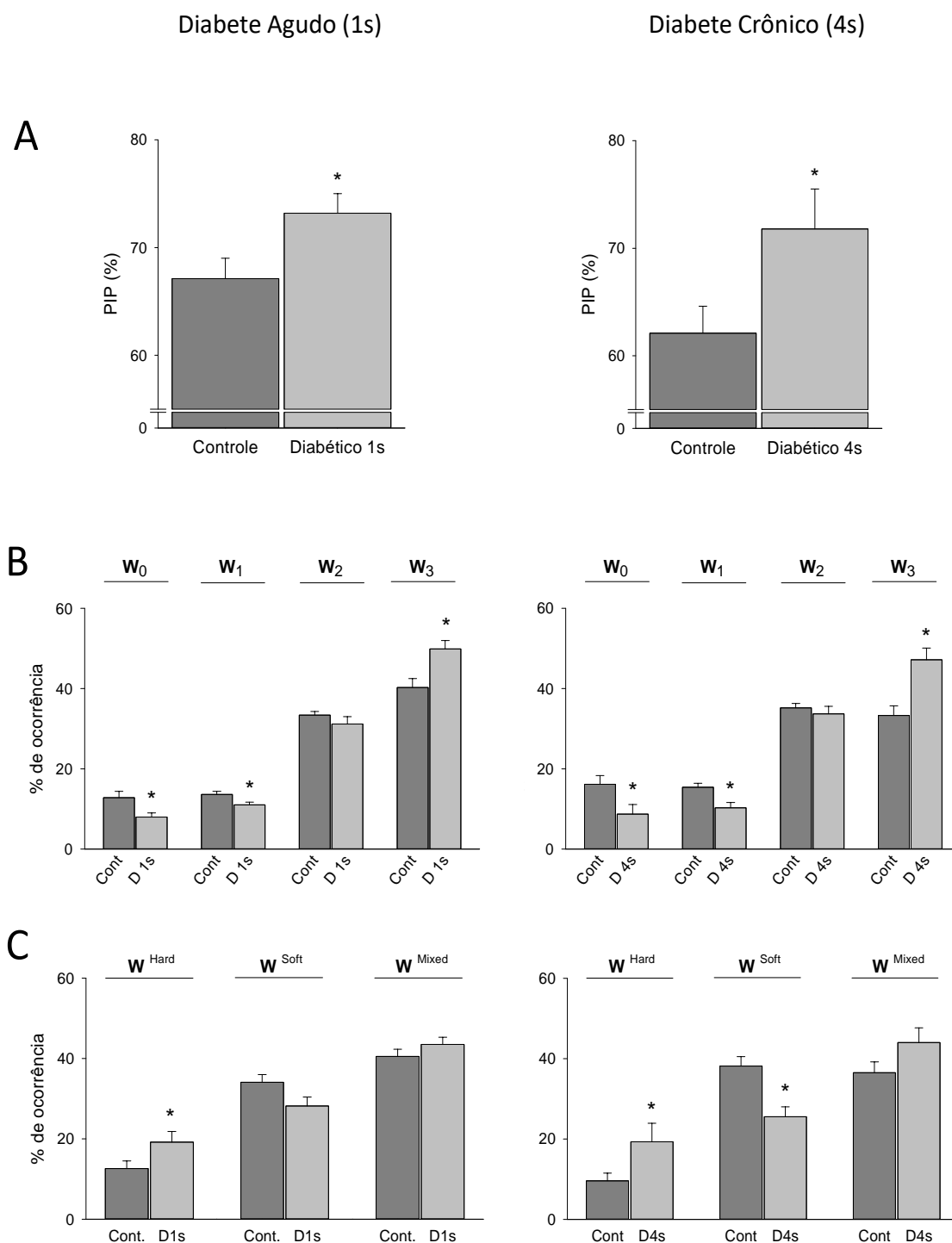


Figura 14: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP) em **(A)**; ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão em **(B)**; ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em **(C)** em animais com diabete agudo (esquerda) ou crônico (direita) e seus respectivos controles normoglicêmicos. As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs. Controle.

6.3 Discussão

Este é o primeiro estudo avaliando a HRF em modelo experimental de DM. De modo geral, a HRF se comporta de forma similar em ratos com DM agudo e crônico. Foi observado uma maior PIP e maior ocorrência de padrões W_3 e W^H (mais fragmentados), e uma menor ocorrência de W_0 e W_1 (padrões mais fluentes) em ambos os modelos (agudo e crônico) quando comparados aos respectivos controles. Entretanto, apesar da similaridade entre os dois modelos, as alterações encontradas na HRF em ratos com DM crônico foram um pouco mais acentuadas. Recentemente, a HRF também foi avaliada em um estudo clínico de DM do tipo 2. Interessante notar que os resultados foram semelhantes aos encontrados no nosso estudo experimental em ratos, ou seja, aumento de padrões fragmentados em pacientes diabéticos (Navaneethakrishna e Manuskandan, 2021).

As alterações da HRV em indivíduos diabéticos são largamente conhecidas. Um estudo da década de 80 já havia mostrado que pacientes diabéticos, mesmo sem a presença de sinais clínicos de disfunção autonômica, apresentam uma variância reduzida do iRR em repouso, além de alterações nos índices espectrais do iRR, sugerindo uma alteração na atividade autonômica do componente vagal e simpático (Pagani *et al.*, 1988). Estudos do nosso grupo de pesquisa também mostraram redução da HRV em modelo experimental de DM induzido pela STZ, sugerindo um prejuízo na modulação autonômica do sistema cardiovascular nesse modelo de DM (Fazan Jr *et al.*, 1999).

É conhecido que a hiperglicemia causada pela DM pode ocasionar lesões em diversos órgãos e tecidos, como o coração e o sistema nervoso. Em geral, as alterações na dinâmica da FC causadas pela DM são associadas aos danos nas fibras autonômicas, que causam marcante diminuição na modulação autonômica cardíaca (Rolim *et al.*, 2008). Porém, o prejuízo causado pela hiperglicemia diretamente nos cardiomiócitos, em especial nas células de marca-passo cardíaco, geralmente não é considerado na interpretação das alterações de HRV.

Os resultados do Estudo 1 mostraram que o duplo bloqueio diminuiu os padrões fragmentados da HRF. Como o DM afeta as fibras autonômicas como um todo, se este fosse o único efeito da DM, a diminuição do controle autonômico

total para o coração deveria ser expressa como uma diminuição dos padrões de HRF. Ao contrário, os níveis maiores de HRF no DM comparado ao seu controle indicam a provável presença de outros mecanismos (não-autonômicos) afetando a dinâmica da frequência cardíaca. Como os resultados no modelo agudo ou crônico foram muito semelhantes, acreditamos em um efeito direto da hiperglicemia no tecido cardíaco, a curto prazo, além dos possíveis efeitos adaptativos mais a longo prazo.

Assim, as alterações humorais causadas pela DM parecem exercer um importante papel no aumento da HRF deste modelo. Outros estudos são necessários para avaliar quais são os principais fatores (se a glicose, diretamente, ou outros fatores) envolvidos no aumento dos padrões fragmentados no DM.

7. Estudo 4

Infarto do Miocárdio & Fragmentação da
Frequência Cardíaca

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as DCVs são um conjunto de distúrbios do coração e vasos sanguíneos e incluem doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular, doença arterial periférica, doença cardíaca reumática, entre outras (WHO, 2021). A presença de fatores de risco clássicos como hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, sedentarismo, tabagismo, DM e histórico familiar de doenças do coração, aumenta a probabilidade de desenvolver DCVs, com ênfase para a doença arterial coronariana (WHO, 2021).

As DCVs são as principais causas de morte no mundo, ceifando quase 18 milhões de vidas a cada ano (WHO, 2021). De todas as mortes por DCV, 85% são devido ao IM e acidentes vasculares periféricos, sendo que um terço dessas mortes ocorre prematuramente em pessoas com menos de 70 anos de idade (WHO, 2021). Segundo o Ministério da Saúde, estima-se que ocorram de 300 a 400 mil casos anuais de IM no Brasil e que a cada 5 a 7 casos, ocorra um óbito (Ministério da Saúde, 2022).

O IM é caracterizado pela a morte isquêmica do tecido miocárdico, causada pela ausência de perfusão decorrente da interrupção súbita do fluxo sanguíneo coronariano (Frangogiannis, 2015; Thygesen, Alpert e White, 2007). A isquemia induz perturbações metabólicas e iônicas no miocárdio, bem como altera, sobremaneira, a modulação autonômica cardíaca, levando à um aumento exacerbado da atividade simpática cardíaca (Cohn *et al.*, 1984; Schwartz e Ferrari, De, 2011). Tais alterações miocárdicas são as principais responsáveis pela alta mortalidade associada à fase aguda do IM (Ciarka, Borne, van de e Pathak, 2008). Após a fase aguda, o processo regenerativo do miocárdio infartado substitui o tecido muscular por uma cicatriz fibrótica. O tecido fibrótico formado no miocárdio mantém a integridade estrutural do ventrículo, porém por não possuir propriedades contráteis, a função sistólica do coração fica comprometida (Frangogiannis, 2015). Assim, a redução funcional do ventrículo infartado promove sobrecarga de trabalho ao miocárdio remanescente levando ao aumento da tensão transmural sistólica e diastólica com consequente estímulo para hipertrofia e remodelamento cardíacos no longo prazo (Pfeffer *et al.*, 1979). Por sua vez, o remodelamento cardíaco após o IM contribui para a diminuição da função cardíaca, tanto sistólica como diastólica (Boateng e Sanborn, 2013; Frangogiannis, 2015). Desse modo, os sobreviventes da fase

agudo do IM geralmente evoluem para um quadro de IC congestiva (Frangogiannis, 2015; Lewis *et al.*, 2003).

No cenário clínico, o IM geralmente é devido à oclusão trombótica aguda de uma artéria coronária decorrente da liberação de substâncias trombogênicas pelo rompimento de uma placa aterosclerótica coronariana. As dislipidemias representam importante fator de risco para o IM, sendo que a lipoproteína de baixa densidade, LDL, é o mais relevante fator de risco modificável para doença arterial coronariana. Estudos com estatinas e outros hipolipemiantes demonstram que níveis mais baixos de LDL se associam à redução proporcional de IM e morte (Précoma *et al.*, 2019).

A relação entre os índices de HRV e o prognóstico de diversas condições fisiopatológicas, como IM e IC, têm sido intensamente estudadas, por serem candidatos a biomarcadores não invasivos de risco cardiovascular. A maioria dos estudos mostraram que pacientes com HRV reduzida têm maior risco de morte dentro de poucos anos após o IM (Chattipakorn *et al.*, 2007; Huikuri *et al.*, 2009; Huikuri e Stein, 2013). No entanto, resultados inconsistentes também foram relatados. Jokinen e colaboradores (Jokinen *et al.*, 2003) avaliaram 600 pacientes entre o quinto e o sétimo dia após IM e 416 pacientes 12 meses após o IM, e nenhum índice de HRV no domínio do tempo ou da frequência foi capaz de prever morte cardíaca nesses pacientes. Em conjunto, esses resultados motivam a busca por um biomarcador mais robusto de risco cardiovascular.

Portanto, considerando que essa nova abordagem nunca foi aplicada em ratos com disfunção cardiovascular, nós avaliamos a HRF em um modelo de IM em ratos, estudado 4 ou 12 semanas após o IM, e correlacionamos os resultados com parâmetros funcionais cardíacos (fração de ejeção e fração de encurtamento). Nossa hipótese é que (1) a HRF está aumentada em ratos submetidos a IM e (2) a HRF está inversamente associada aos índices de função cardíaca.

7.1 Métodos

Animais

Os ratos da linhagem Wistar utilizados nesse estudo foram provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 h e mantidos com ração comercial e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo nº 143/2014). Os dados utilizados neste protocolo foram realizados em estudos recentemente conduzidos em nosso laboratório (Omoto *et al.*, 2021).

Infarto do miocárdio

Para a indução do quadro da IC, ratos Wistar (250-300 g, 7-8 semanas de idade) anestesiados com cetamina/xilazina (50/10 mg/kg i.p., respectivamente) foram intubados e colocados em ventilação mecânica. Uma toracotomia esquerda foi realizada no quinto espaço intercostal para acessar o coração e a artéria coronária descendente anterior foi ocluída com um fio de poliéster, posicionado entre a via de saída da artéria e o átrio esquerdo. Após a ligadura coronariana o tórax foi imediatamente fechado e o ar da cavidade pleural foi retirado por pressão negativa. Um grupo de ratos controle foi submetido à toracotomia e exposição do coração, porém não sofreu ligadura coronariana (SHAM). Os animais receberam analgésico (tramadol cloridrato, 2 mg/kg, s.c.) e antibióticos (benzilpenicilina, 24UI/g, i.m., semanalmente) e foram mantidos em recuperação durante 4 ou 12 semanas.

Protocolo experimental

Os animais previamente submetidos à ligadura da coronária, ou ligadura coronariana fictícia, foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio e implantados com um cateter de polietileno na artéria femoral esquerda, ou na aorta abdominal, para registro direto de PA. A extremidade do cateter foi exteriorizada no dorso dos animais.

No dia seguinte, os ratos acordados e com livre movimentação tiveram a sua PA registrada por 30 min, conforme descrito na página 65. Ao final dos registros, os ratos foram submetidos a exame ecocardiográfico sob anestesia.

Ecocardiografia

Os parâmetros cardíacos foram analisados por meio de ecocardiógrafo (Vevo 2100, Visual Sonics, Canadá) com transdutor de 21 MHz. Os animais foram anestesiados com cetamina-xilazina (50-10 mg/kg, respectivamente), colocados em decúbito dorsal em uma mesa aquecida com suas extremidades fixadas em eletrodos para monitorização eletrocardiográfica. Imagens cardíacas gravadas do modo B paraesternal eixo curto do ventrículo esquerdo (VE) foram adquiridas no nível médio do ventrículo para a medição dos diâmetros diastólico interno (LVIDd) e sistólico (LVIDs) do VE. A fração de ejeção (LVEF) e a fração de encurtamento VE (LVFS) foram calculados da seguinte forma: $LVEF = [(LVIDd3 - LVIDs3) / LVIDd3] \times 100$ e $LVFS = [(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] \times 100$.

Análise de dados

Os registros de PA dos ratos foram utilizados para geração de séries temporais de valores de IP, ou seja, intervalo entre valores sucessivos da PA sistólica. Após a correção dos artefatos, as séries temporais do IP foram utilizadas para o cálculo dos seguintes índices de HRV: Análise do domínio do tempo, domínio da frequência, dinâmica simbólica, entropia, DFA e HRF.

A descrição da geração das séries com valores de IP, correção de artefatos e cálculo dos índices da HRF estão detalhadamente descritas na seção 3 (página 35) desse texto.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças nos índices entre os grupos foram analisadas pelo teste t de Student não pareado ou teste de Wilcoxon. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para calcular a correlação entre a HRF e função cardíaca. As correlações foram calculadas separadamente em animais com 4 ou 12 semanas após IM e seus respectivos controles. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7.2 Resultados

Apesar de não apresentar os resultados, todos os animais possuíam infarto de tamanho similares, e apenas foram incluídos no estudo aqueles com o tamanho do infarto superior a 30% da circunferência total do VE.

A função sistólica, avaliada pela ecocardiografia modo-M, mostrou que tanto a LVEF quanto a LVFS estavam significativamente reduzidas nos ratos com IM quando comparados aos controles, nos dois momentos estudados (4 ou 12 semanas após o IM), **Figura 15**.

Além disso, uma redução na PA sistólica foi observada 12 semanas após IM. Não foi encontrada diferença para PA diastólica e FC entre os grupos nos dois momentos (**Tabela 5**).

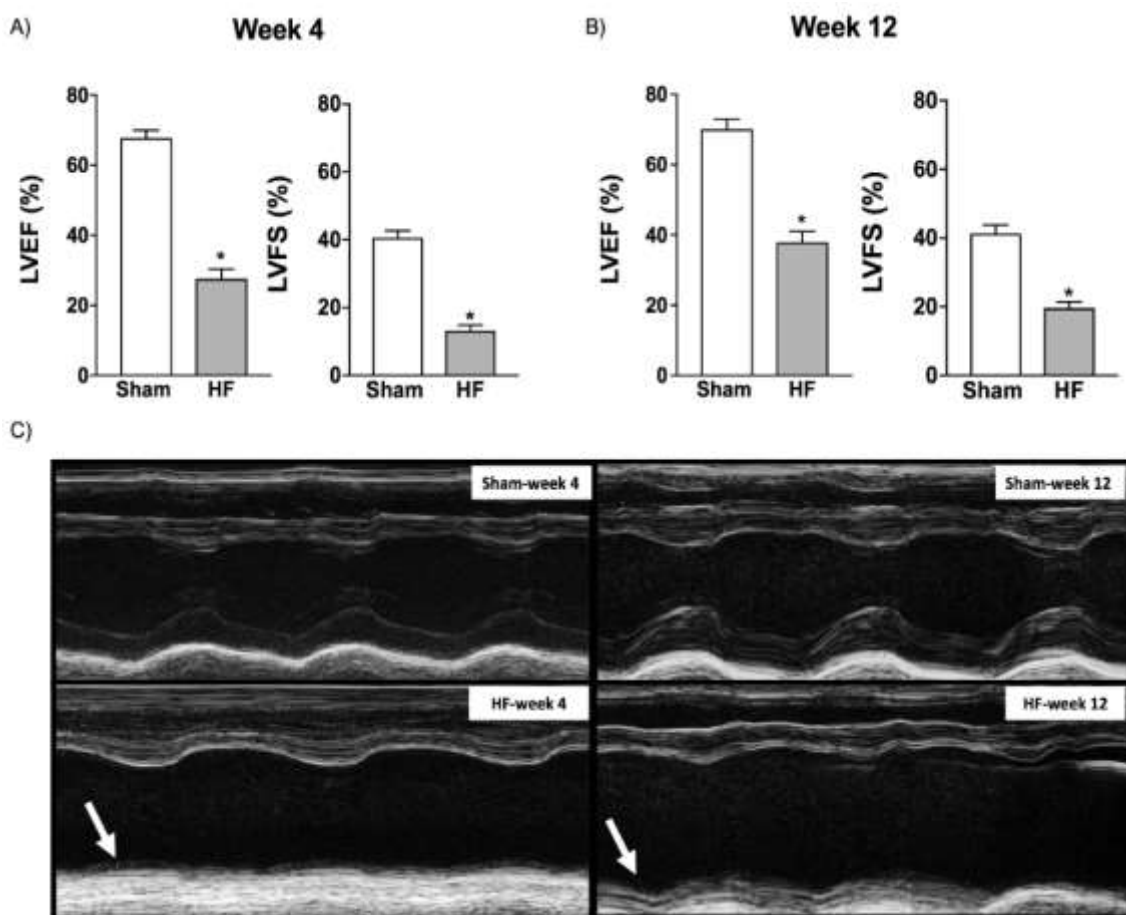


Figura 15: A função sistólica avaliada 4 (A) ou 12 semanas (B) após IM ou cirurgia fictícia. O painel C mostra imagens ecocardiográficas representativas do modo M do ventrículo esquerdo em ratos controle (superior) e infartados

(inferior). As setas brancas indicam acinesias da área infartada. LVEF, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; LVFS, fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. As barras representam a média \pm DPM. * $P < 0,05$ vs. SHAM. (IM 4 semanas: N=10, SHAM: N=12, IM 12 semanas: N=7, SHAM: N=5).

Tabela 5: Pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca de ratos 4 ou 12 semanas após infarto do miocárdio, ou ratos controle (SHAM).

	SHAM	IM 4s	SHAM	IM 12s
PA sistólica (mmHg)	128 \pm 4	122 \pm 2	127 \pm 3	113 \pm 5*
PA diastólica (mmHg)	93 \pm 3	88 \pm 2	92 \pm 5	82 \pm 3
FC (bpm)	371 \pm 16	361 \pm 18	342 \pm 12	344 \pm 6

Os valores representam a média \pm DPM. * $P < 0,05$ vs. SHAM.

bpm: batimentos por minuto

A **Tabela 6** apresenta todos os índices de HRF calculados a partir das séries de IP de ratos 4 ou 12 semanas após o IM e seus respectivos controles.

A **Figura 16** mostra a representação gráfica dos valores mostrados na tabela para os seguintes parâmetros: **(A)** a PIP; **(B)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - dos tipos W_0 a W_3 ; e **(C)** a porcentagem de ocorrência dos padrões - "palavras" - com pontos de inflexão do tipo W^H , W^S ou com ambos os tipos W^M .

Tabela 6: Índices de fragmentação da frequência cardíaca (%) de ratos 4 ou 12 semanas após o IM e seus respectivos controles (SHAM).

	SHAM	IM 4s	SHAM	IM 12s
PIP	81 ± 1	80 ± 2	73 ± 2	81 ± 1*
W ₀	2 ± 0,2	4 ± 1	6 ± 2	2 ± 1*
W ₁	7 ± 1	8 ± 1	12 ± 1	7 ± 1*
W ₂	38 ± 1	33 ± 2*	39 ± 2	40 ± 2
W ₃	53 ± 2	55 ± 3	43 ± 2	51 ± 2*
W ^H	28 ± 3	33 ± 5	20 ± 4	32 ± 5
W ^S	21 ± 3	19 ± 3	33 ± 4	21 ± 6
W ^M	49 ± 1	44 ± 2	42 ± 2	46 ± 2

PIP: Porcentagem total de pontos de inflexão; W₀, W₁, W₂ e W₃: porcentagem de ocorrência de padrões (palavras) com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H, W^S, W^M: porcentagem de ocorrência de padrões (palavras) com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente. Os valores representam a média ± EPM. * P<0,05 vs respectivo controle (SHAM).

Destacamos que a PIP, a ocorrência de padrões W₀, W₁, W₃, W^H, W^S e W^M não alterou nos animais 4 semanas após o IM quando comparada ao seu respectivo controle. Entretanto, a ocorrência de padrões do tipo W₂ foi ligeiramente menor neste mesmo grupo quando comparada ao seu controle.

A PIP e a ocorrência de padrões W₃ foi maior nos animais 12 semanas após o IM quando comparado aos seus respectivos controles. A ocorrência de padrões do tipo W₀ e W₁ diminuiu nos animais 12 semanas após o IM quando comparado aos seus respectivos controles. A ocorrência de padrões W₂, W^H, W^S e W^M não alterou neste mesmo grupo.

Os coeficientes de correlação de Spearman entre os índices de HRF e a função sistólica (LVEF e LVFS) são apresentados na **Tabela 7**. Foi encontrada uma correlação significativa somente em animais 12 semanas após o IM. Aumentos da PIP e W^H foram significativamente associados a reduções na LVEF e LVFS. Por outro lado, o aumento do percentual de “palavras” fluentes W₁ e W^S foi significativamente associado ao aumento da LVEF e LVFS.

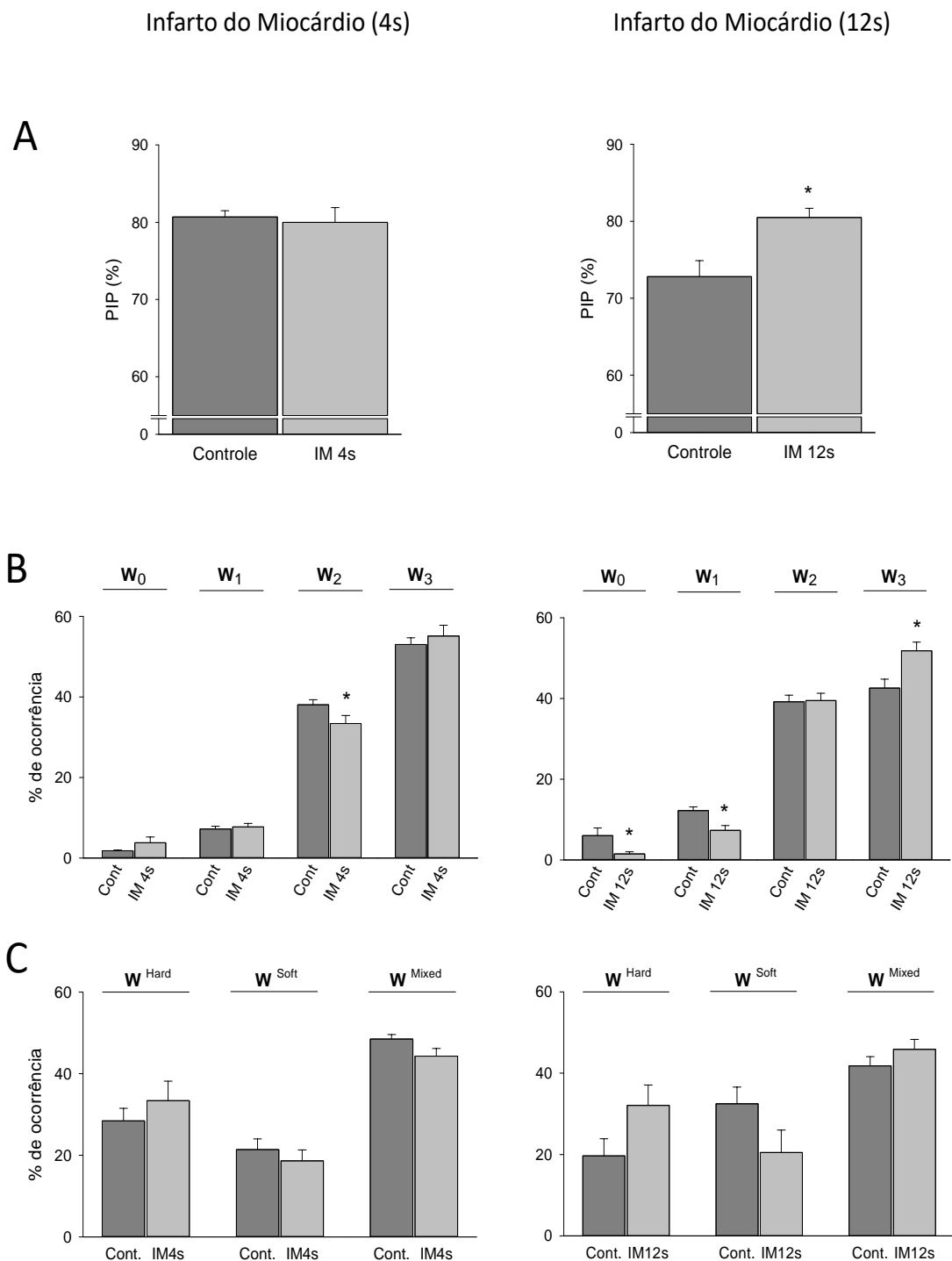


Figura 16: Fragmentação da frequência cardíaca representada pela Porcentagem de Pontos de Inflexão (PIP) em (A); ocorrência de padrões com 0, 1, 2 ou 3 pontos de inflexão em (B); ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*) em (C) em animais 4 ou 12 semanas após o infarto do miocárdio e seus respectivos controles. As barras representam a média \pm EPM. *P<0,05 vs. controles.

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Spearman entre HRF e parâmetros ecocardiográficos de função sistólica (LVEF e LVFS).

	PIP	W ₀	W ₁	W ₂	W ₃	W ^H	W ^S	W ^M
4 semanas								
LVEF	0,16	-0,15	-0,27	0,17	0,03	-0,01	-0,03	0,35
LVFS	0,04	-0,06	-0,19	0,24	-0,08	-0,08	0,05	0,39
12 semanas								
LVEF	-0,68*	0,53	0,67*	-0,05	-0,56	-0,71*	0,73*	-0,18
LVFS	-0,68*	0,51	0,67*	-0,01	-0,56	-0,70*	0,73*	-0,20

PIP: porcentagem de pontos de inflexão; W₀, W₁, W₂ e W₃, porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H, W^S, W^M: porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente; LVEF, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; LVFS, fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. *P < 0,05 para o teste de correlação.

A **Figura 17** mostra a representação gráfica da correlação entre a função sistólica (LVEF) e os índices de fragmentação PIP, W₁, W^H e W^S em animais 4 ou 12 semanas após o IM.

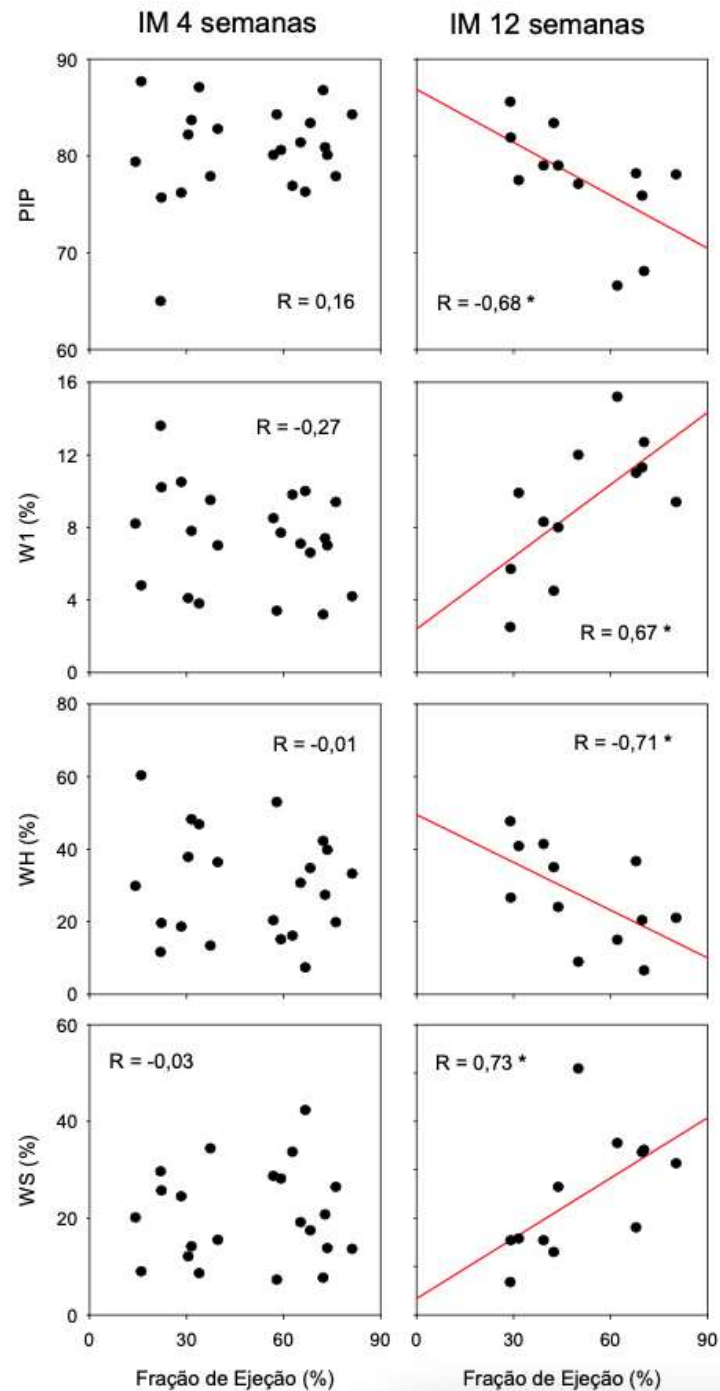


Figura 17: Gráficos de dispersão dos índices de HRF (PIP, W_1 , W^H e W^S) e parâmetros ecocardiográficos da função sistólica (LVEF). O coeficiente de correlação de Pearson (R) é mostrado em cada gráfico.

PIP: porcentagem de pontos de inflexão; W_1 porcentagem de ocorrência de padrões com 1 ponto de inflexão; W^H , W^S porcentagem de ocorrência de padrões com pontos de inflexão dos tipos *hard* e *soft*, respectivamente; LVEF, fração de ejeção do ventrículo esquerdo. * $P < 0,05$ para o teste de correlação.

7.3 Discussão

A redução da LVEF e LVFS no exame ecocardiográfico indica que o IM levou a uma disfunção cardíaca em ratos tanto 4 como 12 semanas após a ligadura coronariana. Além disso, a redução da PA sistólica, um preditor independente de risco de mortalidade em pacientes com IC (Fonarow *et al.*, 2005), foi observada nos animais avaliados 12 semanas após IM. Está bem estabelecido que a modulação cardiovascular neuro-humoral é significativamente afetada após IM no cenário clínico como experimental (Francis *et al.*, 2001; Huikuri e Stein, 2013; Schwartz e Ferrari, De, 2011). No entanto, estudos do nosso laboratório com esse modelo de IC mostraram que nenhum dos índices usuais de HRV (lineares e não lineares) está alterado em ratos com IM quando comparado aos seus respectivos controles, entre 4 e 12 semanas após a ligadura (Omoto *et al.*, 2021; Sabino *et al.*, 2013).

Embora achados controversos tenham sido relatados sobre a eficácia dos índices de HRV no domínio do tempo e da frequência para caracterizar o risco cardiovascular após IM (Jokinen *et al.*, 2003; Rovere, La *et al.*, 1998), os índices não lineares da HRV se mostraram uma ferramenta muito confiável para estratificação de risco em pacientes com doença isquêmica e não isquêmica (Maestri *et al.*, 2007; Perkiömäki *et al.*, 2008; Stein *et al.*, 2005). Em particular, o expoente DFA em escala de curto prazo foi demonstrado como um dos índices mais robustos para estimar o risco após IM em humanos (Huikuri *et al.*, 2000; Mäkikallio *et al.*, 2001). Essa inconsistência pode ser resultado das diferentes espécies estudadas (humanos *versus* ratos) e deve ser cuidadosamente levada em consideração ao traduzir os achados de uma espécie para outra.

Por outro lado, os achados da análise de HRF, ou seja, aumento da PIP e W_3 , juntamente com a diminuição dos padrões fluentes (W_0 e W_1) apontam para uma maior HRF em ratos com IM. Ressalta-se que a HRF foi a única abordagem capaz de detectar diferenças entre ratos com IM e ratos controles saudáveis. Além disso, a alteração da HRF neste modelo é tempo dependente, ou seja, somente animais 12 semanas após o IM mostraram aumento da HRF, mesmo que a função cardíaca (LVEF e LVFS) já esteja consideravelmente afetada 4 semanas após IM. A extensão desses achados para humanos após IM deve ser avaliada em estudos posteriores.

Outro achado interessante foi a forte associação entre HRF e função cardíaca (LVEF e LVFS). PIP e W^H associaram-se negativamente tanto à LVEF quanto à LVFS, ou seja, quanto maior a PIP e W^H , menor a LVEF e a LVFS. W_1 e W^S associaram-se positivamente tanto à LVEF quanto à LVFS, ou seja, quanto menor W_1 e W^S , menor a LVEF e a LVFS. A direção dessas associações é esperada, uma vez que maior HRF tem sido observada em condições de maior risco, como envelhecimento ou DCVs (Costa *et al.*, 2018; Costa e Goldberger, 2019). Contudo, a correlação entre HRF e os índices de função cardíaca só foi observada em animais após 12 semanas do IM. Esses resultados sugerem fortemente que, apesar de existir uma correlação entre HRF e função cardíaca, a HRF não deve ser uma consequência direta da função alterada. Em outras palavras, é mais provável que a função cardíaca alterada esteja afetando outros fatores a longo prazo, que por sua vez tornam a FC mais fragmentada. De fato, a informação contida nas séries de intervalo cardíaco não reflete de maneira direta a função sistólica cardíaca (contratilidade dos cardiomiócitos de trabalho), mas sim as propriedades elétricas/rítmicas do tecido cardíaco (células de marca-passo), que provavelmente sofrem, a longo prazo, o efeito da função alterada.

A função cardíaca prejudicada após o IM é frequentemente acompanhada por uma ativação simpática reflexa (Schwartz e Ferrari, De, 2011), identificada, por exemplo, pelo aumento da norepinefrina plasmática tanto em pacientes com IM como em modelos experimentais de IM (Cohn *et al.*, 1984). No entanto, essa hiperativação simpática nem sempre é claramente observada quando os componentes de frequência da série intervalo cardíaco foram avaliados, uma vez que a potência na banda LF dos espectros da frequência cardíaca pode aumentar ou diminuir na presença de um tônus simpático mais alto (Borne, van de *et al.*, 1997; Galinier *et al.*, 2000; Mortara *et al.*, 1994; Rovere, La *et al.*, 2003). Além disso, como se sabe que o IM leva à inflamação e remodelação miocárdica (Prabhu e Frangogiannis, 2016), a hipótese mais razoável para o aumento da HRF encontrado em ratos com IM é comprometimento elétrico do tecido cardíaco que surge a longo prazo com o remodelamento cardíaco, potencialmente agravado pela hiperatividade simpática crônica.

Assim como nos outros modelos estudados, é desafiador separar o efeito autonômico dos outros fatores capazes de afetar a HRF após o IM. Porém, fica claro que os efeitos a curto prazo do IM não afetam a HRF, e que o

remodelamento do tecido cardíaco induzido pela IM, a longo prazo, deve ser o principal fator na gênese da HRF. Mais estudos são necessários para identificar os mecanismos específicos capazes de afetar a HRF com o remodelamento cardíaco.

8. Correlação entre índices HRF e HRV

Índices lineares e não lineares da HRV classicamente conhecidos e amplamente utilizados, como índices no domínio de tempo, domínio de frequência, dinâmica simbólica, DFA e entropia, foram calculados a partir de séries de iRR e IP e verificadas suas correlações com os índices de HRF. Isso foi feito para verificar se as informações fornecidas pelos índices da HRF estão relacionadas com as informações fornecidas por métodos clássicos da HRV. Quando correlações significativas e fortes são detectadas entre dois índices, assumimos que eles representam, de forma semelhante, a dinâmica da FC.

8.1 Métodos

O coeficiente de correlação de Spearman (R) foi utilizado para calcular a correlação entre a HRF e os demais índices de HRV citados. As correlações foram calculadas usando todas as condições estudadas em conjunto, ou seja, animais após a realização do bloqueio autonômico, animais diabéticos, hipertensos e após IM com seus respectivos controles. Correlações fortes foram assumidas quando o coeficiente de correlação $R > 0,8$.

8.2 Resultados

A **Tabela 8** mostra os coeficientes de correlação calculados entre os índices de HRF e os demais índices tradicionais da HRV. Os índices de HRF PIP, W_3 e W^H , se correlacionaram positivamente com RMSSD e HF. Já o índice W_0 se correlacionou negativamente com RMSSD e HF (índices classicamente conhecidos de modulação vagal).

Tabela 8: Coeficientes de correlação de Spearman entre HRF e índices tradicionais da HRV.

	PIP	W ₀	W ₁	W ₂	W ₃	W ^H	W ^S	W ^M
SDNN	0,70*	-0,75*	-0,14*	0,68*	0,63*	0,73*	-0,07	0,59*
RMSSD	0,92*	-0,93*	-0,31*	0,71*	0,87*	0,94*	-0,25*	0,79*
LF	0,64*	-0,72*	-0,05	0,74*	0,57*	0,69*	0,03	0,57*
HF	0,89*	-0,94*	-0,26*	0,79*	0,82*	0,90*	-0,16*	0,78*
LF/HF	-0,15*	0,07	0,17*	0,15*	-0,18*	-0,08	0,19*	-0,11*
0V	-0,27*	0,21*	0,22*	-0,01	-0,29*	-0,20*	0,19*	-0,24*
1V	-0,18*	0,04	0,20*	0,28*	-0,30*	-0,32*	0,42*	-0,08
2LV	0,05	-0,11*	-0,08	0,20*	-0,02	-0,04	0,06	0,09
2UV	0,48*	-0,36*	-0,28*	-0,01	0,57*	0,51*	-0,38*	0,41*
SampEn	0,32*	-0,36*	-0,10	0,35*	0,26*	0,24*	0,003	0,34*
DistEn	0,74*	-0,80*	-0,24*	0,68*	0,68*	0,74*	-0,15*	0,66*
DFA_α1	-0,20*	0,15*	0,17*	0,04	-0,22*	-0,16*	0,18*	-0,15*
DFA_α2	-0,15*	0,21*	0,05	-0,27*	-0,1	-0,19*	0,004	-0,12*

PIP: porcentagem de pontos de inflexão; W₀, W₁, W₂ e W₃, porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com 0, 1, 2 e 3 pontos de inflexão, respectivamente; W^H, W^S, W^M: porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com pontos de inflexão dos tipos *hard*, *soft* ou ambos (*mixed*), respectivamente; SDNN: desvio padrão dos intervalos cardíacos normais; RMSSD: raiz quadrada média de diferenças sucessivas; LF e HF: potência do espectro nas banda de baixa- e alta- frequência; 0V: porcentagem de padrões sem variação; 1V: porcentagem de padrões com uma variação; 2LV: porcentagem de padrões com duas variações semelhantes; 2UV: porcentagem de padrões com duas variações diferentes; DFA: análise de flutuação destendenciadas ($\alpha 1: 5 \leq n \leq 15$, $\alpha 2: 20 \leq n \leq 100$); SampEn: entropia amostral; DistEn: entropia de distribuição; *P < 0,05 para coeficiente de correlação. As correlações fortes estão destacadas em negrito.

A **Figura 18** mostra a representação gráfica das correlações entre HRF (PIP, W_0 , W_3 e W^H) e índices tradicionais de HRV associados à modulação parassimpática cardíaca (RMSSD, HF e 2UV).

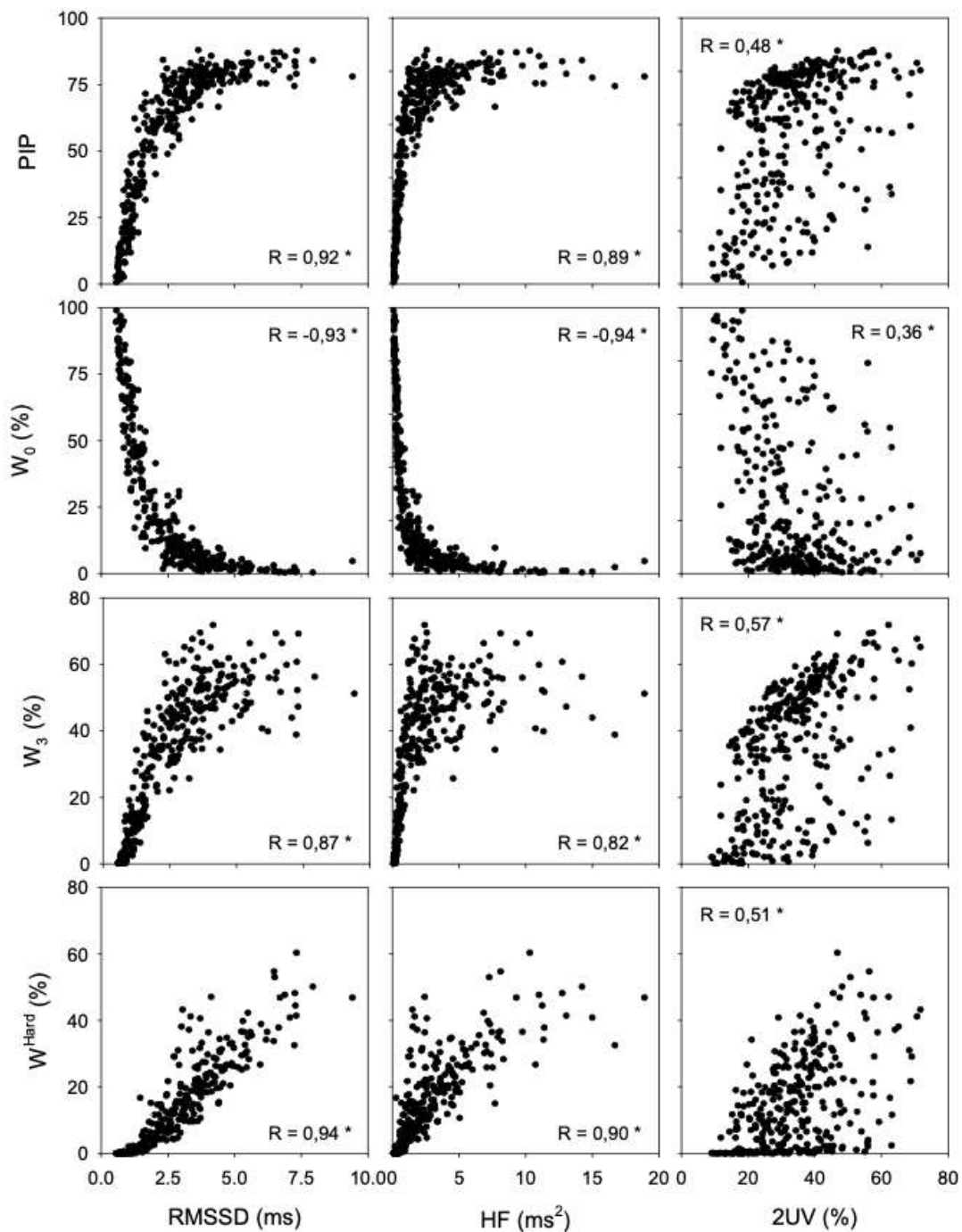


Figura 18: Gráficos de dispersão dos índices de HRF (PIP, W_0 , W_3 e W^H) e índices tradicionais da HRV associados à modulação parassimpática cardíaca (RMSSD, HF e 2UV). O coeficiente de correlação de Pearson (R) é mostrado em cada gráfico. PIP: porcentagem de pontos de inflexão; W_0 e W_3 , porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com 0, e 3 pontos de inflexão,

respectivamente; W^H porcentagem de ocorrência de padrões (“palavras”) com pontos de inflexão dos tipos *hard*; RMSSD: raiz quadrada média de diferenças sucessivas; HF: potência do espectro na banda de alta frequência; 2UV: porcentagem de padrões com duas variações diferentes. * $P < 0,05$ para o teste de correlação.

8.3 Discussão

Foram encontradas correlações fortes entre a HRF e alguns índices tradicionais da HRV, principalmente RMSSD e potência do espectro em HF, índices classicamente conhecidos por estarem associados ao controle cardíaco parassimpático. Isso reforça os resultados apresentados no “Estudo 1” de que o parassimpático tem um papel importante na HRF. Como mencionado anteriormente, isso poderia ser explicado pela proximidade entre as bandas de frequência associadas às oscilações de alta frequência (modulação parassimpática) e a frequência de oscilação dos padrões de HRF. Em outras palavras, a faixa de frequência onde a modulação vagal e os padrões de HRF ocorrem podem se sobrepor.

Contudo, apesar da forte correlação entre HRF e índices da HRV associados à modulação vagal cardíaca, não consideramos as informações dos índices da HRF como redundantes. Diversos índices da variabilidade cardiovascular, incluindo os não lineares, contêm informações sobre a modulação autonômica para o coração e os vasos, sendo essas informações complementares. Por exemplo, é conhecido que a entropia amostral diminui após manobra postural passiva (*tilt test*), situação reconhecidamente marcada por um desvio do balanço simpato-vagal para o componente simpático (Porta, Gneccchi-Ruscione, *et al.*, 2007). Contudo, a entropia não é uma medida de modulação simpática ou parassimpática, como demonstrado, por exemplo, em estudos experimentais com bloqueio autonômico, já que tanto o bloqueio simpático como o bloqueio vagal diminuem a entropia (Silva *et al.*, 2017). Acreditamos que a HRF, da mesma forma, seja influenciada pelo balanço simpato-vagal sem, contudo, ser um índice que reflete a atividade do simpático ou parassimpático separadamente. Além disso, é importante notar que o valor e relevância de cada índice calculado podem mudar de acordo com a condição

clínica (ou experimental). Por exemplo, no modelo do rato com IC induzida pelo IM não há alterações nos índices da HRV comumente usados. Entretanto, a HRF foi capaz de mostrar as alterações cardiovasculares presentes nesse modelo. Outro fato importante é a ausência de correlação entre a HRF e os índices da dinâmica simbólica (especialmente o índice 2UV, também conhecido por estar relacionado com a modulação vagal). Como os índices de HRV representam uma medida indireta da modulação da FC, reforçamos a importância de utilizar diferentes métodos de análise da dinâmica da FC, visto que nenhum deles é capaz de descrever as características do sistema cardiovascular sozinho (Voss *et al.*, 2009). Assim, ainda que correlacionados com outros índices de HRV, acreditamos que a HRF possa fornecer informação complementar aos outros índices de HRV sobre a dinâmica cardiovascular. De fato, correlação alta apenas indica que duas medidas tendem a seguir uma relação monotônica (direta ou inversa), não podendo ser interpretada como concordância ou causalidade entre as medidas.

Por fim, destacamos o fato de que nenhuma correlação forte foi encontrada entre os índices de HRV e os padrões do W_1 , W_2 , W^S e W^M . Estes padrões podem ter um papel importante na representação de fenômenos não autonômicos, como é o caso do W^S , que não está alterado após nenhum tipo de bloqueio autonômico cardíaco (ver “Estudo 1”).

9. Conclusão

Em geral, nossos achados mostraram que a HRF parece ter como origem diferentes mecanismos, tanto autonômicos como não autonômicos.

Em modelos saudáveis de ratos, apenas o sistema nervoso parassimpático é capaz de alterar a HRF, sendo que os padrões contendo apenas pontos de inflexão do tipo *soft* (W^S) não são afetados. Já nos modelos experimentais de doenças, observamos que a HRF é afetada tanto por mecanismos de curto prazo, DM, como longo prazo, IM, e que a hiperativação simpática, bem como níveis pressóricos elevados, por si só, não parece influenciar os padrões de HRF. Em conjunto, os achados sugerem que a HRF é resultado de um mecanismo complexo de regulação, que envolve as propriedades elétricas/rítmicas do tecido cardíaco e seus fatores modulatórios (autonômicos e humorais).

A HRF é uma abordagem recente que demonstrou estar associada ao risco cardiovascular em humanos. No presente estudo, exploramos os padrões de HRF em diferentes condições experimentais no intuito de identificar seus possíveis determinantes. Estudos mecanísticos poderão fornecer informações mais precisas sobre as vias de ação capazes de influenciar a HRF. Porém, como o sistema cardiovascular (e o organismo como um todo) é um sistema complexo, é um desafio interpretar fenômenos “macroscópicos” (como a dinâmica da FC) através dos elementos microscópicos (por exemplo, células de marca-passo cardíaco) visto que as informações produzidas são decorrentes da interação dos elementos do sistema, de forma que o comportamento global do sistema não pode ser explicado pelo comportamento das partes isoladas. Apesar da dificuldade em identificar os mecanismos individuais envolvidos em sua gênese, a HRF não parece ser ambígua em relação aos outros índices de HRV existente, e seu valor como marcador de risco cardiovascular podem complementar os índices de HRV existentes atualmente.

10. Referências

BARROSO, W. K. S. *et al.* Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2020.

BENICHO, T. *et al.* Heart rate variability in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–19, 2018.

BILLMAN, G. E. Heart rate variability - A historical perspective. **Frontiers in Physiology**, v. 2 NOV, n. November, p. 1–13, 2011.

BOATENG, S.; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Disease-a-Month**, v. 59, n. 3, p. 83–96, 2013.

BORNE, P. VAN DE *et al.* Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1449–1454, mar. 1997.

BORON, V. F.; BOULPAEP, E. L. Regulação da pressão arterial e do débito cardíaco. *In: Fisiologia Médica*. 2º Edição ed. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 554–576.

BOYKO, E. J. *et al.* **IDF Diabetes Atlas - 10th Edition**, 2021. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>

BURKE, S. L.; EVANS, R. G.; HEAD, G. A. Effects of chronic symptho-inhibition on renal excretory function in renovascular hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 29, n. 5, p. 945–952, 2011.

CAMPOS, R. R. *et al.* Mechanisms of renal sympathetic activation in renovascular hypertension. **Experimental physiology**, v. 100, n. 5, p. 496–501, abr. 2015.

CANNON, B. Organization for Physiological Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. IX, n. 3, p. 399–431, 1929.

CASTIGLIONI, P. *et al.* Local scale exponents of blood pressure and heart rate variability by detrended fluctuation analysis: effects of posture, exercise, and aging. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, v. 56, n. 3, p. 675–684, mar. 2009.

CERUTTI, S. *et al.* Non-linear regularity of arterial blood pressure variability in patient with atrial fibrillation in tilt-test procedure. **Europace**, v. 16, n. September, p. iv141–iv147, 2014.

CHATTIPAKORN, N. *et al.* Heart rate variability in myocardial infarction and heart failure. **International journal of cardiology**, v. 120, n. 3, p. 289–296, set. 2007.

CIARKA, A.; BORNE, P. VAN DE; PATHAK, A. Myocardial infarction, heart failure and sympathetic nervous system activity: new pharmacological approaches that affect neurohumoral activation. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 9, p. 1315–1330, set. 2008.

COHN, J. N. *et al.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 13, p. 819–823, set. 1984.

COSTA, M. D. *et al.* Heart rate fragmentation as a novel biomarker of adverse cardiovascular events: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–14, 2018.

COSTA, M. D. *et al.* Prediction of Cognitive Decline Using Heart Rate Fragmentation Analysis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 13, p. 708130, 2021.

COSTA, M. D.; DAVIS, R. B.; GOLDBERGER, A. L. Heart rate fragmentation: A new approach to the analysis of cardiac interbeat interval dynamics. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–13, 2017a.

____. Heart rate fragmentation: A symbolic dynamical approach. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2017b.

____. Heart rate fragmentation: A symbolic dynamical approach. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. NOV, p. 20–21, 2017c.

COSTA, M. D.; GOLDBERGER, A. L. Heart rate fragmentation: Using cardiac pacemaker dynamics to probe the pace of biological aging. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 316, n. 6, p. H1341–H1344, 2019.

COSTA, M.; GOLDBERGER, A. L.; PENG, C.-K. Multiscale entropy analysis of biological signals. **Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics**, v. 71, n. 2 Pt 1, p. 21906, fev. 2005.

DARGIE, H. J.; FRANKLIN, S. S.; REID, J. L. Plasma noradrenaline concentrations in experimental renovascular hypertension in the rat. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 52, n. 5, p. 477–483, 1977.

DEFRONZO, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. July, 2015.

DOREY, T. W.; MOGHTEADAEI, M.; ROSE, R. A. Altered heart rate variability in angiotensin II-mediated hypertension is associated with impaired autonomic nervous system signaling and intrinsic sinoatrial node dysfunction. **Heart Rhythm**, v. 17, n. 8, p. 1360–1370, 2020.

FAZAN JR, R. *et al.* Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. p. 489–495, 1999.

FAZAN JR, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. v. 8, n. 1, p. 19–29, 2001.

FISHER, J. P.; PATON, J. F. R. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: Implications for hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 8, p. 463–475, 2012.

FONAROW, G. C. *et al.* Risk stratification for in-hospital mortality in acutely decompensated heart failure: classification and regression tree analysis. **JAMA**, v. 293, n. 5, p. 572–580, fev. 2005.

FRANCIS, J. *et al.* Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 281, n. 5, p. R1734-45, nov. 2001.

FRANGOGIANNIS, N. G. Pathophysiology of myocardial infarction. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 2015.

FREITAS, S. C. F. *et al.* A method to assess heart rate variability in neonate rats:

Validation in normotensive and hypertensive animals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 8, p. 8–13, 2020.

GALINIER, M. *et al.* Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. **European heart journal**, v. 21, n. 6, p. 475–482, mar. 2000.

GOLDBERGER, A. L. the Normal Heartbeat Chaotic or Homeostatic? v. 6, p. 87–91, 2012.

GOLDBERGER, A. L.; PENG, C. K.; LIPSITZ, L. A. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 1, p. 23–26, 2002.

GOLDBLATT, H. *et al.* Studies on experimental hypertension: i. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **The Journal of experimental medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–379, fev. 1934.

GOYAL, S. N. *et al.* Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 49–63, 2016.

GRASSI, G. *et al.* Essential hypertension and the sympathetic nervous system. **Neurological Sciences**, v. 29, n. SUPPL. 1, p. 33–36, 2008.

GUZZETTI, S. *et al.* Sympathetic predominance in essential hypertension: a study employing spectral analysis of heart rate variability. **Journal of hypertension**, v. 6, n. 9, p. 711–717, set. 1988.

GUZZETTI, S. *et al.* Symbolic dynamics of heart rate variability: A probe to investigate cardiac autonomic modulation. **Circulation**, v. 112, n. 4, p. 465–470, 2005.

HAYANO, J. *et al.* Impact of heart rate fragmentation on the assessment of heart rate variability. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 9, 2020.

HUIKURI, H. V *et al.* Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 47–53, jan. 2000.

HUIKURI, H. V *et al.* Prediction of fatal or near-fatal cardiac arrhythmia events in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. **European heart journal**, v. 30, n. 6, p. 689–698, mar. 2009.

HUIKURI, H. V; STEIN, P. K. Heart rate variability in risk stratification of cardiac patients. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 56, n. 2, p. 153–159, 2013.

IVANOV, P. C. *et al.* Multifractality in human heartbeat dynamics. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 461–465, jun. 1999.

JOKINEN, V. *et al.* Temporal changes and prognostic significance of measures of heart rate dynamics after acute myocardial infarction in the beta-blocking era. **The American journal of cardiology**, v. 92, n. 8, p. 907–912, out. 2003.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

KYRIAZIS, M. Practical applications of chaos theory to the modulation of human ageing: Nature prefers chaos to regularity. **Biogerontology**, v. 4, n. 2, p. 75–90, 2003.

LANGEWITZ, W.; RÜDDEL, H.; SCHÄCHINGER, H. Reduced parasympathetic cardiac control in patients with hypertension at rest and under mental stress. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 122–128, 1994.

LENSEN, I. S. *et al.* Heart rate fragmentation gives novel insights into non-autonomic mechanisms governing beat-to-beat control of the heart 's rhythm. 2020.

LEWIS, E. F. *et al.* Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 8, p. 1446–1453, out. 2003.

LIPSITZ, L. A. Age-related changes in the “complexity” of cardiovascular dynamics: A potential marker of vulnerability to disease. **Chaos (Woodbury, N.Y.)**, v. 5, n. 1, p. 102–109, mar. 1995.

LIPSITZ, L. A.; GOLDBERGER, A. L. Loss of “complexity” and aging. Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. **JAMA**, v. 267, n. 13, p. 1806–1809, abr. 1992.

MACHADO, B. H.; ZOCCAL, D. B.; MORAES, D. J. A. Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 6, p. R864–R872, 2017.

MAESTRI, R. *et al.* Nonlinear indices of heart rate variability in chronic heart failure patients: redundancy and comparative clinical value. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 18, n. 4, p. 425–433, abr. 2007.

MAHER, S. *et al.* Review on HRV based Prediction and Detection of Heart Disease. **International Journal of Computer Applications**, v. 179, n. 46, p. 7–12, 2018.

MÄKIKALLIO, T. H. *et al.* Fractal analysis and time- and frequency-domain measures of heart rate variability as predictors of mortality in patients with heart failure. **The American journal of cardiology**, v. 87, n. 2, p. 178–182, jan. 2001.

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

MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 707–719, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Infarto Agudo do Miocárdio**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/i/infarto>>.

MONTANO, N. *et al.* Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v. 90, n. 4 I, p. 1826–1831, 1994.

MORTARA, A. *et al.* Can power spectral analysis of heart rate variability identify a high risk subgroup of congestive heart failure patients with excessive sympathetic activation? A pilot study before and after heart transplantation.

British heart journal, v. 71, n. 5, p. 422–430, maio 1994.

NABEL, E. G.; GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. Pathophysiology of Experimental Renovascular Hypertension. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 5, n. 4, p. A111–A119, 1985.

NAVANEETHAKRISHNA, M.; MANUSKANDAN, S. R. Analysis of Heart Rate Variability in Normal and Diabetic ECG signals using Fragmentation Approach. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, p. 1112–1115, 2021.

NOBRE, F. *et al.* Antihypertensive Agents Have Different Ability to Modulate Arterial Pressure and Heart Rate Variability in 2K1C Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 19, n. 10, p. 1079–1083, 2006.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–293, mar. 1963.

OMOTO, A. C. M. *et al.* Heart rate fragmentation, a novel approach in heart rate variability analysis, is altered in rats 4 and 12 weeks after myocardial infarction. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 59, n. 11–12, p. 2373–2382, 2021.

PAGANI, M. *et al.* Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 23, n. 2, p. 143–153, 1988.

PAGANI, M.; LUCINI, D. Autonomic dysregulation in essential hypertension: Insight from heart rate and arterial pressure variability. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 90, n. 1–2, p. 76–82, 2001.

PENG, C. K. *et al.* Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. **Chaos**, v. 5, n. 1, p. 82–87, 1995.

PERKIÖMÄKI, J. S. *et al.* Autonomic markers as predictors of nonfatal acute coronary events after myocardial infarction. **Annals of noninvasive electrocardiology : the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc**, v. 13, n. 2, p. 120–129, abr. 2008.

PFEFFER, M. A. *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circulation research**, v. 44, n. 4, p. 503–512, abr. 1979.

PICKERING, T. G. Renovascular hypertension: etiology and pathophysiology. **Seminars in nuclear medicine**, v. 19, n. 2, p. 79–88, abr. 1989.

PORTA, A.; TOBALDINI, E.; *et al.* Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 1, p. H702–8, jul. 2007.

PORTA, A.; GNECCHI-RUSCONE, T.; *et al.* Progressive decrease of heart period variability entropy-based complexity during graded head-up tilt. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 4, p. 1143–1149, out. 2007.

PRABHU, S. D.; FRANGOIANNIS, N. G. The Biological Basis for Cardiac

Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. **Circulation research**, v. 119, n. 1, p. 91–112, jun. 2016.

PRAVENEC, M. *et al.* Recent progress in the genetics of spontaneously hypertensive rats. **Physiological Research**, v. 63, n. SUPPL., 2014.

PRÉCOMA, D. B. *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787–891, 2019.

ROLIM, L. C. D. S. P. *et al.* Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: Risk factors, clinical impact and early diagnosis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 4, p. 23–31, 2008.

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

ROVERE, M. T. LA *et al.* Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. **Circulation**, v. 107, n. 4, p. 565–570, fev. 2003.

SABINO, J. P. J. *et al.* The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 173, n. 1–2, p. 58–64, jan. 2013.

SALMAN, I. M. Current Approaches to Quantifying Tonic and Reflex Autonomic Outflows Controlling Cardiovascular Function in Humans and Experimental Animals. **Current Hypertension Reports**, v. 17, n. 11, 2015.

SCHROEDER, E. B. *et al.* Hypertension, Blood Pressure, and Heart Rate Variability: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1106–1111, 2003.

SCHWARTZ, P. J.; FERRARI, G. M. DE. Sympathetic-parasympathetic interaction in health and disease: abnormalities and relevance in heart failure. **Heart failure reviews**, v. 16, n. 2, p. 101–107, mar. 2011.

SERAVALLE, G.; GRASSI, G. Sympathetic Nervous System, Hypertension, Obesity and Metabolic Syndrome. **High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, v. 23, n. 3, p. 175–179, 2016.

SERAVALLE, G.; MANCIA, G.; GRASSI, G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. **High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention**, v. 21, n. 2, p. 89–105, 2014.

SHAFFER, F.; MCCRATY, R.; ZERR, C. L. A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. **Frontiers in Psychology**, v. 5, n. September, p. 1–19, 2014.

SILVA, L. E. V. Sistemas não lineares e complexidade na análise da variabilidade da frequência cardíaca. Artigo 2. **Sociedade Brasileira de Hipertensão**, v. 20, p. 116–123, 2017.

SILVA, L. E. V. *et al.* The role of sympathetic and vagal cardiac control on

complexity of heart rate dynamics. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 3, p. H469–H477, 2017.

SILVA, L. E. V.; FAZAN, R. J.; MARIN-NETO, J. A. PyBioS: A freeware computer software for analysis of cardiovascular signals. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 197, p. 105718, ago. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diabetes**. Disponível em: <<https://diabetes.org.br/#diabetes>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Número de Diabetes no Mundo**. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-mundo/>>.

SOUZA, H. C. D. *et al.* Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 139, n. 1–2, p. 38–45, 2008.

STAUSS, H. Physiologic mechanisms of heart rate variability. **Hrv** 2006, v. 14, n. 1, p. 8–15, 2006.

STAUSS, H. M. Heart rate variability. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, n. 5, p. R927–31, nov. 2003.

STEIN, P. K. *et al.* Heart rate variability is confounded by the presence of erratic sinus rhythm. **Computers in Cardiology**, v. 29, p. 669–672, 2002.

STEIN, P. K. *et al.* Traditional and nonlinear heart rate variability are each independently associated with mortality after myocardial infarction. **Journal of cardiovascular electrophysiology**, v. 16, n. 1, p. 13–20, jan. 2005.

TAKAHASHI, A. C. M. *et al.* Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis. **Internal and emergency medicine**, v. 7, n. 3, p. 229–235, jun. 2012.

TASK FORCE. Guidelines Heart rate variability. **European Heart Journal**, v. 17, p. 354–381, 1996.

THYGESEN, K.; ALPERT, J. S.; WHITE, H. D. Universal Definition of Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 22, p. 2173–2195, 2007.

VOSS, A. *et al.* Methods derived from nonlinear dynamics for analysing heart rate variability. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 367, n. 1887, p. 277–296, jan. 2009.

WELCH, P. D. The Use of Fast Fourier Transform for the Estimation of Power Spectra. **IEEE Transactions on audio and electroacoustics**, n. 2, p. 70–73, 1967.

WHO. **Cardiovascular Disease - WHO**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>.

WILLIAMS, B. *et al.* **2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension**. [s.l.: s.n.]. v. 39

YANIV, Y.; LAKATTA, E. G.; MALTSEV, V. A. From two competing oscillators to one coupled-clock pacemaker cell system. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–8, 2015.

YANIV, Y.; LYASHKOV, A. E.; LAKATTA, E. G. Impaired signaling intrinsic to sinoatrial node pacemaker cells affects heart rate variability during cardiac disease. **Journal of clinical trials**, v. 4, n. 1, mar. 2014.

YUDA, E. *et al.* Increased Heart Rate Fragmentation Predicts Mortality Risk Among End-Stage Renal Disease. **14th International Symposium on Medical Information Communication Technology (ISMICT)**, 2020.